

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program:

Biologie

Studijní obor:

Genetika, molekulární biologie a virologie



Bc. Dominika Karasová

**Molekulární mechanismy mutagenese a rezistence u buněčných
linií CML**

Molecular mechanisms of mutagenesis and resistance in CML cell
lineages

Diplomová práce

Školitel: RNDr. Nikola Čuřík, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Václava Polívková

Praha 2018

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Praha 10. 8. 2018

Podpis

Poděkování:

Ráda bych poděkovala vedoucímu své diplomové práce RNDr. Nikolovi Čuříkovi, Ph.D. za cenné rady, ochotu a trpělivost, které mi během vedení práce poskytl. Děkuji celému kolektivu na Oddělení molekulární genetiky ÚHKT za milé a přátelské prostředí, zvláště Mgr. Václavě Polívkové za pomoc a velikou ochotu při náročných experimentech. Mé poděkování také patří vedoucí oddělení Mgr. Kateřině Machové Polákové, Ph.D. za cenné rady a možnost zpracování diplomové práce na Oddělení molekulární genetiky. Děkuji také za spolupráci laboratoři CLIP v rámci Kliniky dětské hematologie a onkologie 2. LF UK a FN Motol.

Abstrakt

Chronická myeloidní leukemie je klonální onemocnění krvetvorby, pro které je charakteristický fúzní gen BCR-ABL1. Ačkoli léčba tyrosinkinázovými inhibitory (TKI) dosáhla zásadního zlepšení přežívání pacientů, u 20-30 % dochází k rozvoji rezistence. Jednou z hlavních příčin selhání léčby jsou mutace v kinázové doméně (KD) BCR-ABL1. Cílem této práce bylo objasnit molekulární mechanismy vzniku rezistence a mutageneze u CML s využitím *in vitro* modelu CML. Hlavní část této práce byla věnována identifikaci genů reagujících na poškození DNA a zodpovědných za reparaci DNA, které by mohly hrát roli v procesu mutageneze BCR-ABL1. Metodou RT² Profiler PCR Arrays jsme ze skupiny vybraných genů odpovídajících na poškození DNA a jejich oprav identifikovali geny XRCC6 a PARP1, jejichž genová exprese se signifikantně a specificky snižovala v průběhu mutageneze KD BCR-ABL1. Produkty těchto genů se účastní oprav dvouřetězcových zlomů cestou nehomologního spojování konců (NHEJ). Při studiu mutageneze KD BCR-ABL1 jsme dále zjistili, že klony, které mutace vyvinuly, nevykazovaly na začátku kultivace zvýšenou expresi BCR-ABL1 oproti klonům, které mutace nevyvinuly.

Klíčová slova: myeloidní leukemie, mutace, TKI rezistence, genová exprese, XRCC6, PARP1

Abstract

Chronic myeloid leukemia is a clonal haematopoietic disease, with characteristic BCR-ABL1 fusion gene. Despite the significant improvement in patient treated with tyrosine kinase inhibitors (TKI), 20–30 % of patients develop resistance. One of the main causes of treatment failure are mutations in the BCR-ABL1 kinase domain (KD). The aim of this work was to elucidate the molecular mechanisms of resistance and mutagenesis development in CML using an in vitro CML model KCL-22. The main part of this work was focused on the identification of genes involved in DNA damage response and repair, that could play a role in the process of mutagenesis of BCR-ABL1. We used the RT2 Profiler PCR Arrays method for the group of selected genes regulating DNA damage response and repair. We identified the genes XRCC6 and PARP1 whose gene expression was significantly and specifically decreased during KD BCR-ABL1 mutagenesis. Products of these genes are involved in repairing DNA double-strand breaks through non-homologous end joining (NHEJ). During study of the KD BCR-ABL1 mutagenesis we also found that clones, which developed mutations, did not show the increased BCR-ABL1 expression in the beginning of the culture compared to the clones in which mutations have not evolved.

Key words: myeloid leukemia, mutation, resistance to TKI, gene expression, XRCC6, PARP1

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Přehled literatury.....	3
2.1	Historie výzkumu chronické myeloidní leukemie	3
2.2	Epidemiologie CML.....	4
2.3	Fáze CML a její klinické projevy.....	5
2.4	Charakteristika CML	5
2.4.1	Obecná charakteristika	5
2.4.2	Proto-onkogen a protein ABL1	6
2.4.3	Proto-onkogen a protein BCR	7
2.4.4	Fúzní onkogen a onkoprotein Bcr-Abl	8
2.5	BCR-ABL1 signalizace.....	9
2.5.1	MAPK signální dráha	9
2.5.2	PI3K/AKT/mTOR signální dráha	9
2.5.3	JAK/STAT/(MYC) signální dráha	10
2.6	Léčba CML – inhibitory TKI.....	11
2.6.1	Inhibitory I. generace – imatinib.....	11
2.6.2	Inhibitory II. generace.....	12
2.6.2.1	Nilotinib	12
2.6.2.2	Dasatinib	12
2.6.2.3	Bosutinib.....	13
2.6.3	Inhibitory III. generace	13
2.6.3.1	Ponatinib.....	13
2.6.4	Rezistence na léčbu TKI.....	13
2.6.4.1	Mechanismy rezistence nezávislé na BCR-ABL1.....	14

2.6.4.2	Mechanismy závislé na BCR-ABL1	14
2.7	Mutace v kinázové doméně BCR-ABL1	15
2.7.1	Mutageneze BCR-ABL1 <i>de novo</i>	17
2.8	Reparace DNA	19
2.8.1	Odpověď na poškození DNA	19
2.8.2	Reparace DNA	20
2.8.2.1	Oprava vystřížením bází (BER)	20
2.8.2.2	Oprava vystřížením nukleotidů (NER)	20
2.8.2.3	Homologní rekombinace (HR)	21
2.8.2.4	Nehomologní spojování konců (NHEJ)	21
3	Hypotéza a cíle diplomové práce	23
4	Materiál a metody	25
4.1	Laboratorní přístroje a reagenty.....	25
4.2	Použitá buněčná linie	27
4.3	Použité klony a jejich mutační charakteristika.....	27
4.4	Kultivace buněčných linií a klonů	28
4.5	Pasáž buněk a klonů KCL-22	28
4.6	Izolace RNA.....	29
4.7	RT-qPCR.....	29
4.8	Měření proliferace	31
4.9	Měření apoptózy	32
4.10	MTT assay.....	33
4.11	RT ² Profiler PCR Arrays	33
5	Výsledky.....	39
5.1	Stanovení citlivosti buněčných kultur na IM.....	39

5.1.1	Růst klonů v čase a různých koncentracích IM v závislosti na expresi molekuly CD38.....	40
5.1.2	Stanovení míry proliferace klonů KCL-22	42
5.1.3	Stanovení míry apoptózy klonů KCL-22	43
5.1.4	Hladina exprese BCR-ABL1.....	45
5.1.5	Expresní arrays.....	46
5.1.5.1	KCL-22 CD38- Klon B8 (T315I).....	48
5.1.5.2	KCL-22 CD38- Klon B10 (Y253H)	52
5.1.5.3	KCL-22 CD38- Klon E4 (WT)	56
5.1.5.4	KCL-22 CD38- Klon F4 (E255K).....	60
5.1.5.5	KCL-22 CD38- Kontrolní klon B4	65
5.1.5.6	KCL-22 CD38- Kontrolní klon B5	67
5.1.5.7	KCL-22 CD38- Kontrolní klon B8	69
5.1.5.8	Výsledky analýzy změn genové exprese.....	71
6	Diskuze.....	75
7	Závěr	81
8	Seznam použité literatury	83

Seznam zkratek

Zkratka	Anglicky	Česky
AKT	AKT serine/threonine kinase 1	AKT serin/treoninová kináza 1
ATP	Adenosine triphosphate	Adenosintrifosfát
ATRA	All-trans retinoic acid	All-transretinová kyselina
BCR	Breakpoint cluster region	Oblast shluku [DNA] zlomů
BCR-ABL1	Breakpoint cluster region-C-abl oncogene 1	Fúzní gen BCR-ABL1
BER	Base excision repair	Oprava vystřižením báze
c-ABL	Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1	Homolog Abelsonova myšího leukemického virového onkogenu
CD38	cluster of differentiation 38 (cyclic ADP ribose hydrolase)	Diferenciační shluk 38 (hydroláza cyklickéADP ribózy)
cDNA	Complementary DNA	Komplementární DNA
CML	Chronic myelogenous leukemia	Chronická myeloidní leukemie
C-MYC	MYC proto-oncogene, bHLH transcription factor	Protoonkogen MYC z bHLH rodiny transkripčních faktorů
Crk	chicken tumor virus	Virus kuřecího nádoru
DDR	DNA damage response	Odpověď na poškození DNA
DNA	deoxyribonucleic acid	Deoxyribonukleová kyselina
DNA-PKcs	DNA-dependent protein kinase	DNA dependentní proteinkináza
DSB	Double strand break repair	Oprava dvouřetězcového zlomu
dsDNA	Double-strand DNA	Dvouřetězcová DNA
dNTP	Deoxyribonucleotide	Deoxyribonukleotid
ECS	Electro Cupling Solution	
ETAA1	ETAA1, ATR kinase activator	ETAA1 aktivátor kinázy ATR
FoxO	Forkhead box O	
GAP	GTPase-activating proteins	Proteiny aktivující GTPázu
GDP	guanosine diphosphate	Guanosindifosfát
GEF	Guanine nucleotide exchange factors	Faktory zajišťující výměnu nukleotidu guaninu
GG-NER	Global genomic nucleotide excision repair	Celogenomová oprava vystřižením nukleotidu
GTP	Guanosine-5'-triphosphate	Guanosintrifosfát
GUS	β-glucuronidase	β-glukoronidáza
H2AX	H2A histone family member X	Člen X rodiny H2A histonů
hOCT-1	The human organic cation transporter type 1	Lidský transportér organických kationtů typu 1
HR	Homologous recombination	Homologní rekombinace
HSP90	heat shock protein 90	Protein teplotního šoku
IM	Imatinib Mesylate	Imatinib Mesylát
JAK	Janus kinase	Janusova kináza
KAT5	Lysine acetyltransferase 5 KAT5	Acetyltransferáza lysinů KAT5
KD	Kinase domain	Kinázová doména
KIT	KIT proto-oncogene receptor tyrosine kinase	KIT proto-onkogenní receptorová tyrosinkináza
Ku70	ATP-dependent DNA helicase Ku70	DNA helikáza Ku70 závislá na ATP
Ku80	ATP-dependent DNA helicase Ku80	DNA helikáza Ku80 závislá na ATP
LSD1	LSD1 zinc finger family protein	LSD1 protein z rodiny proteinů se zinkovým prstem
MDR-1	Multidrug resistance protein/p-glykoprotein	Protein vícečetné lékové rezistence/p-glykoprotein
Mek	Mitogen-activated protein kinase kinase	Mitogenem aktivovaná kináza proteinkinázy

Zkratka	Anglicky	Česky
miRNA	MicroRNA	MikroRNA
MMEJ	Microhomology-mediated end-joining	Spojování konců zprostředkované oblasti mikrohomologie
MRN	MRE11-Rad50-NSB1 complex	Komplex MRE11-Rad50-NSB1
MTOR	Mechanistic target of rapamycin kinase	Mechanistický cíl rapamycinové kinázy
NAD+	Nicotinamide adenine dinucleotide	Nikotinamidadenindinukleotid
NER	Nukleotide excision repair	Oprava vystřížením nukleotidu
NHEJ	Non-homologous end joining	Nehomologní spojení konců
NTC	Negative control	Negativní kontrola
p53	Tumor protein p53	Tumorový protein p53
PDGFR	Platelet-derived growth factor receptor	Receptor pro růstový faktor odvozený od trombocytů
Ph+/-	Positive/negative Philadelphia chromosome	Přítomný/nepřítomný Filadelský chromozom
PI3K	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase	Fosfatidylinositol-3-kináza
POLB	Polymerase (DNA directed), beta	DNA řízená polymeráza beta
POLD3	Polymerase (DNA-directed), delta 3, accessory subunit	Přístupová podjednotka DNA řízené polymeráza delta 3
Rac	Rac family small GTPase	Malá GTPáza z rodiny Rac proteinů
Raf	Raf-1 Proto-Oncogene	Raf-1 protoonkogen
Ras	Ras Proto-Oncogene	Ras protoonkogen
Rho	Rho guanine nucleotide exchange factor	Rho faktor zajišťující výměnu nukleotidu guaninu
RNA	Ribonucleic acid	Ribonukleová kyselina
ROS	Reactive Oxygen Species	Kyslíkové radikály
CSF-1R	colony stimulating factor 1 receptor	Receptor pro faktor 1 podporující růst kolonií
SSA	single-strand annealing	Jednořetězcové nasedání [primerů]
SSB	Single strand break repair	Oprava jednořetězcového zlomu
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription	Převodník signálu a aktivátor transkripce
TAE	Tris(hydroxymethyl)aminomethan-acetate-ethylenediaminetetraacetic acid	tris(hydroxymethyl)aminometan-octan-ethylendiamintetraoctová kyselina
TC-NER	Transcription coupled nukleotide excision repair	Vystřihovací oprava nukleotidů spojená s transkripcí
TKI	Tyrosine kinase inhibitor	Tyrosinkinázový inhibitor
TopBP1	DNA topoisomerase 2; binding protein 1	Protein 1 vázající DNA topoizomerázu 2
XLFI	XRCC4-like factor	Faktor podobný XRCC4

1 Úvod

Chronická myeloidní leukemie (CML) je klonální myeloproliferativní onemocnění vycházející z transformované leukemické kmenové buňky, při kterém dochází v první fázi k nadměrné produkci granulocytů a jejich progenitorů. Pro toto onemocnění je charakteristická přítomnost fúzního genu BCR-ABL1, obvykle vznikajícího v důsledku reciproké translokace genetického materiálu mezi dlouhými raménky chromozomů 9 a 22. Výsledkem přestavby je gen kódující chimerický protein Bcr-abl vykazující deregulovanou zvýšenou tyrosinkinázovou aktivitu. Na základě pochopení molekulární podstaty tohoto onemocnění bylo následně možné vyvinout cílenou léčbu zaměřenou na inhibici kinázové aktivity BCR-ABL1. CML je v současné době velice dobře léčitelné onemocnění. Prvním vyvinutým inhibitorem BCR-ABL1 aktivity byl imatinib mesylát, používaný dodnes jako nejčastější preparát v první linii léčby u nově diagnostikovaných pacientů. Imatinib se váže na neaktivní konformaci BCR-ABL1 poblíž nukleotidového místa pro ATP a inhibuje tak dosažení aktivní konformace nezbytné pro kinázovou aktivitu. Ačkoliv je imatinib obecně vhodným lékem pro léčbu CML, jehož použití vedlo k dramatickému zlepšení výsledků léčby, určití pacienti proti němu vykazují nebo si postupně vyvinou rezistenci. Rezistence na léčbu u CML může mít různé příčiny. Zhruba ve 30 % případů jsou za vznik rezistence na imatinib odpovědné mutace v kinázové doméně BCR-ABL1, které brání vazbě léku na Bcr-Abl. Tento stav vedl k vývoji inhibitorů II. a následně III. generace, které cílí i na mutované formy kinázové domény BCR-ABL1 vykazující rezistenci na imatinib. Celkově bylo popsáno bezmála sto různých aminokyselinových substitucí, které narušují či přímo brání vazbě imatinibu na kinázovou doménu. Ačkoliv je význam mutací v kinázové doméně BCR-ABL1 pro vznik rezistence poměrně dobře prostudovaný, do dnešní doby se úplně nepodařilo identifikovat molekulární mechanismy, které jsou zodpovědné za vznik a rozvoj mutací v BCR-ABL1. Ve své diplomové práci jsem se s využitím *in vitro* modelu KCL-22 buněk CML zaměřila na identifikaci genů reagujících na poškození DNA a zodpovědných za reparaci DNA, které by mohly hrát roli v procesu mutageneze BCR-ABL1.

2 Přehled literatury

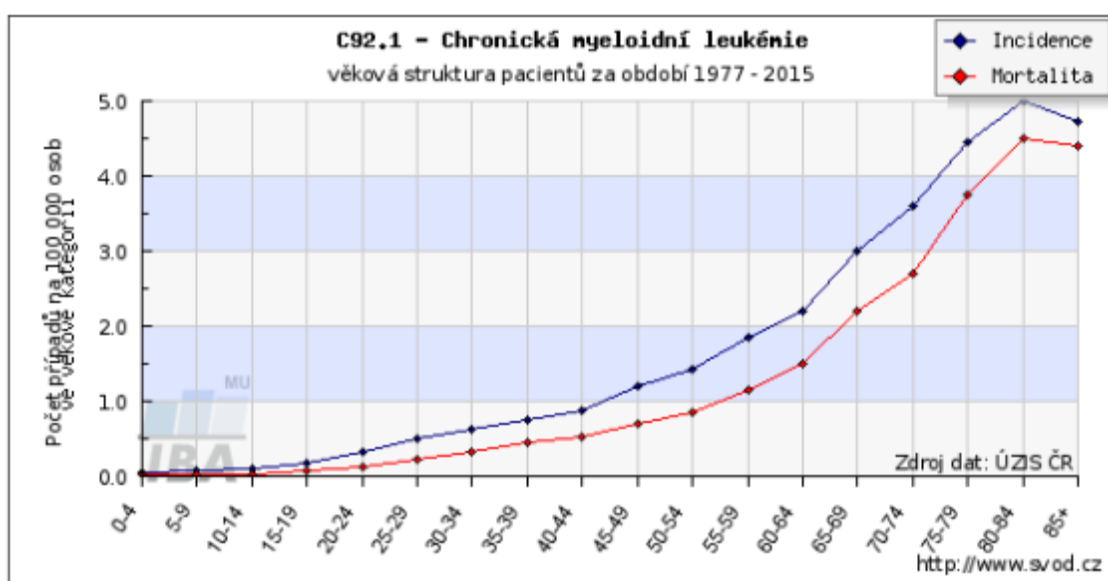
2.1 Historie výzkumu chronické myeloidní leukemie

Historie výzkumu leukemie začíná v první polovině 19. století. První popis chronické myeloidní leukemie (CML) je připisován britskému lékaři Johnu H. Bennetovi, ačkoliv částečné popisy tohoto onemocnění se objevovaly již o několik let dříve. Termín leukemie byl ale poprvé použit až německým lékařem Rudolfem Virchowem v roce 1847 (Geary, 2000). V roce 1857 Nikolaus Friedreich poprvé popsal akutní formu leukemie a v roce 1889 Wilhelm Ebstein zavedl termin akutní leukemie, aby odlišil progresivní leukemii od chronické (Keane *et al.*, 1965). O téměř 70 let později došlo k rozluštění molekulární podstaty CML. Roku 1960 popsali dva výzkumníci z Filadelfie Peter Nowell a David Hungerford chromozomální abnormalitu. U 7 nemocných pacientů byl pozorován malý chromozom (Nowell & Hungerford, 1960), který následně získal název Philadelfský chromozom. V roce 1973 tento abnormální chromozom popsala americká genetička Janet Rowley jako výsledek reciproké translokace chromozomů 9 a 22 (Rowley, 1973). O 9 let později de Klein *et al.* objevili lidský buněčný homolog (c-abl) genu Abelsonova viru myší leukemie, lokalizovaný na dlouhém raménku chromozomu 9, který hraje roli při již zmiňované reciproké translokaci u CML (de Klein *et al.*, 1982). O dva roky později vychází studie, ve které Groffen *et al.* identifikovali na chromozomu 22 translokační zlomovou doménu, pro kterou navrhli termín "breakpoint cluster region", zkráceně BCR (Groffen *et al.*, 1984). V roce 1985 Shtivelman *et al.* charakterizovali specifický transkript jako produkt fuzního genu BCR-ABL1 a došli k závěru, že konečný produkt tohoto genu, chimerický protein Bcr-abl se pravděpodobně podílí na patogenezi tohoto maligního onemocnění (Shtivelman *et al.*, 1985).

2.2 Epidemiologie CML

Chronická myeloidní leukemie představuje přibližně 15–20 % ze všech leukemií. Incidence onemocnění se udává od 1,0 - 1,5 případů na 100 000 obyvatel (Faber *et al.*, 2010). Onemocnění je v dětství vzácné a jeho výskyt se zvyšuje s přibývajícím věkem (graf 1) a je častěji zaznamenávána u mužů. Věkový medián záchytu je u CML kolem 60 let. Pacienti v České republice ve věku 65–80 let představují až 35 % ze všech pacientů s CML. Za posledních 40 let incidence onemocnění v ČR mírně kolísala a k roku 2015 představuje 0,9 případů na sto tisíc obyvatel. Mortalita díky cílené molekulární léčbě tyrosinkinázovými inhibitory (TKI) výrazně klesla na 0,3 případů na 100 000 obyvatel.

(www.svod.cz , <http://www.svod.cz/report.php?diag=C92.1&type=pdf>).



Graf 1 - Věková struktura pacientů s CML během let 1997–2015. Zobrazení věkově specifické incidence a mortality na 100 000 obyvatel v dané věkové kategorii. Graf – www.svod.cz, data – ÚZIS ČR (Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR).

2.3 Fáze CML a její klinické projevy

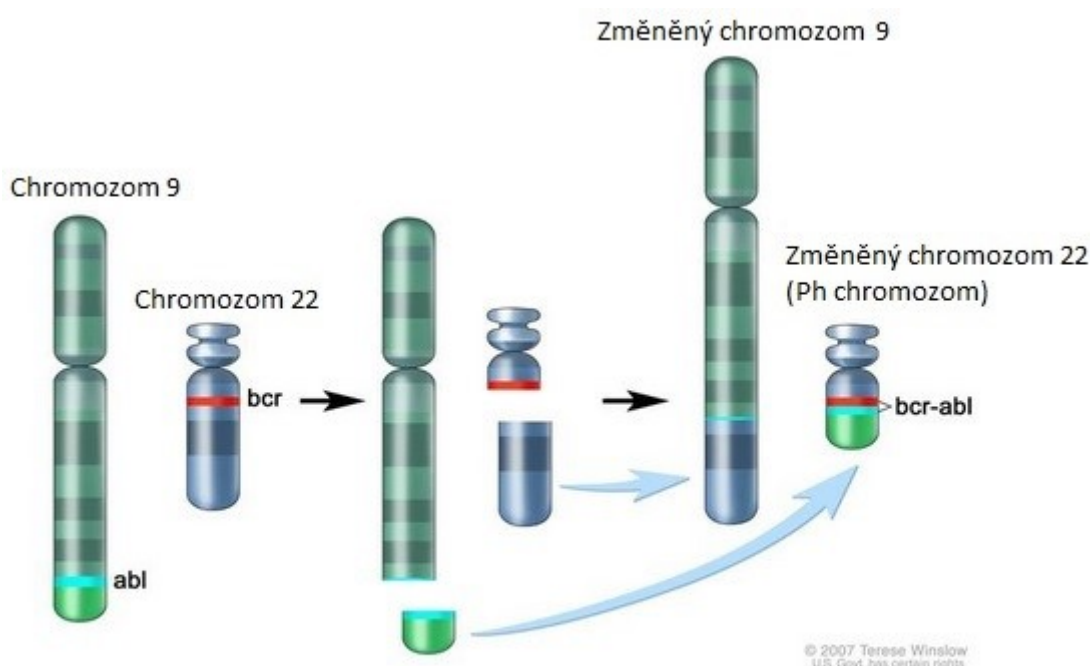
V onemocnění CML rozeznáváme tři fáze: chronickou, akcelerovanou a blastickou. Chronická fáze nemá často žádné či má jen mírné příznaky, může trvat měsíce až roky a je nejlépe ovlivnitelná léčbou. Blasty, což jsou nezralé krevní buňky omezující normální krvetvorbu, tvoří jen malou část krevních buněk. Po nasazení léčby tyrosinkinázovými inhibitory (TKI) dochází ke zmírnění až vymizení potíží a v tomto ustáleném stavu může pacient při pravidelném užívání léků setrvat i desítky let. Pokud není onemocnění léčeno, přechází po čase obvykle do akcelerované fáze definované 10–20 % blastů v periferní krvi. Tuto fázi provází řada potíží, a to bolesti kloubů a kostí, teploty, hubnutí, krvácení či zvětšující se slezina. Pacient přestává reagovat na léčbu a mohou se objevit mutace v kinázové doméně fúzního genu BCR-ABL1. Poslední fáze s nejhorší prognózou je fáze blastického zvratu (někdy onemocnění přechází z chronické fáze rovnou do blastického zvratu bez přechodné, akcelerované fáze). V této fázi je nemoc podobná akutní leukemii a počet blastů představuje více než 20 % krevních buněk v kostní dřeni či periferní krvi. Pokud to zdravotní stav pacienta umožňuje, přistupuje se často k transplantaci krvetvorných buněk (Žáčková, 2012; Faber *et al.*, 2010).

2.4 Charakteristika CML

2.4.1 Obecná charakteristika

Chronická myeloidní leukemie se řadí mezi klonální myeloproliferativní onemocnění, kdy dochází k nadměrné produkci buněk myeloidní krevní řady. Pro CML je charakteristická cytogenetická změna, která nese název Philadelfský chromozom. Tato odchylka je důsledkem reciproké translokace mezi chromozomy 9 a 22, t (9;22)(q34;q11). Výsledkem je fúzní gen BCR-ABL1, který kóduje defektní fúzní protein Bcr-Abl s deregulovanou tyrosinkinázovou aktivitou. Takto zvýšeně aktivní protein narušuje buněčnou signalizaci, navozuje proliferaci a nadprodukcí transformovaných buněk (Shtivelman *et al.*, 1985). Až u 90 % pacientů s CML nacházíme typickou přestavbu t (9;22)(q34;q11). U 5 % pacientů se vyskytuje

translokace chromozomu 9 a jiného chromozomu nebo tzv. komplex, který zahrnuje přestavbu typickou a zároveň i další chromozom (Jabbour *et al.*, 2016). Existuje i malé procento pacientů, kteří jsou Ph negativní, což znamená, že pomocí cytogenetického vyšetření u nich není detekován typický Ph chromozom. Pro tento případ existuje termín kryptická translokace či maskovaný Ph chromozom (Faber *et al.*, 2010).



Obr. 1 – Reciproká translokace chromozomů 9 a 22. Chromozom 9 nese ABL1 gen a chromozom 22 BCR gen. Výsledkem reciproké translokace je Filadelfský chromozom s onkogenem BCR-ABL1 (převzato a upraveno dle: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms?cdrid=44179>)

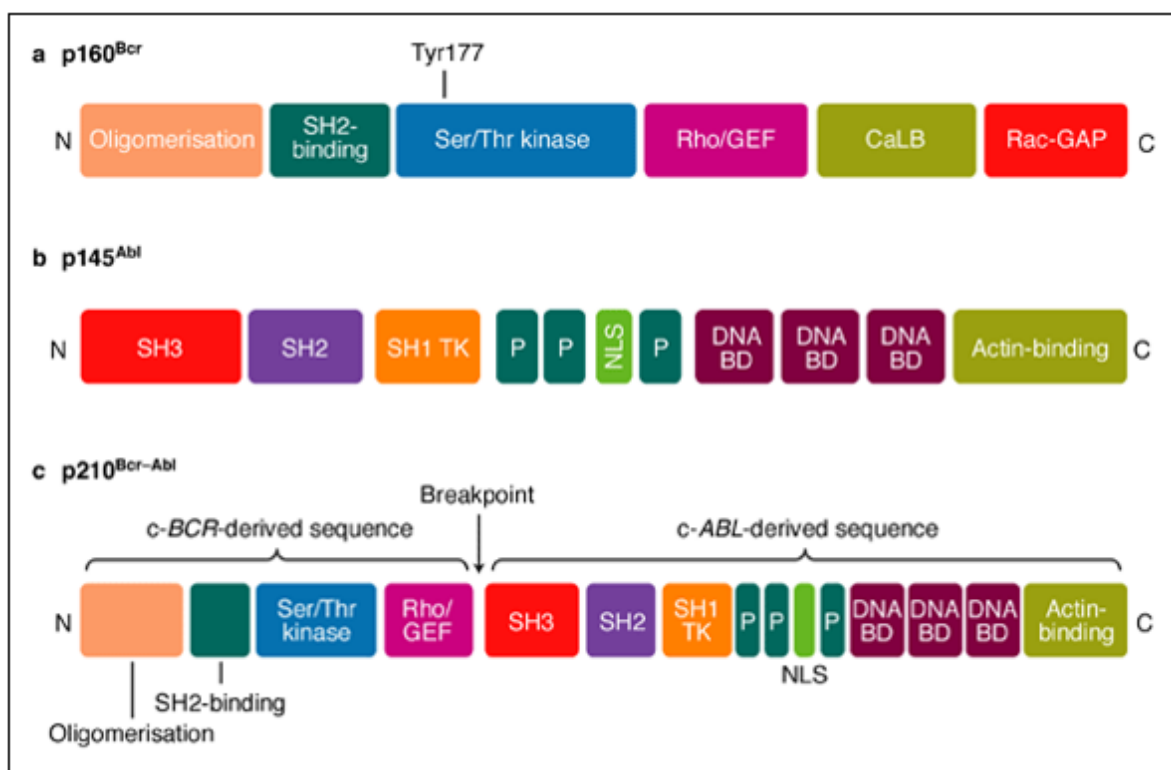
2.4.2 Proto-onkogen a protein ABL1

Lidský ABL1 gen je homologem onkogenu objeveného v Abelsonově viru myší leukemie a nachází se na dlouhém raménku chromozomu 9 v pozici 34.12. Tento gen kóduje protein s p145ABL vyskytující se jednak v cytoplasmě asociovaný s F-aktinem, tak i v jádře, kde se váže na chromatin (Laneuville, 1995; Van Etten *et al.*, 1989). P145ABL reguluje mnoho buněčných procesů, a to například buněčné dělení, indukci apoptózy či diferenciaci. Proto-onkogen ABL kóduje nереceptorovou

tyrosinkinázu a vyskytuje se ve dvou isoformách, které vznikají alternativním sestřihem prvního exonu (Laneuville, 1995). Protein ABL1 obsahuje na svém N-konci několik „src homology“ (SH) domén, což je zkratka, která se používá k označení homologních domén i v jiných proteinech. Konkrétně Abl1 obsahuje domény SH1, která má tyrosinkinázovou funkci, dále SH2 a SH3 doménu interagující s dalšími proteiny. SH2 váže fosforylovaný tyrosin a SH3 interaguje s prolinovými oblastmi. V proteinu se dále nachází jaderné lokalizační signály (NLS, cílí protein do buněčného jádra)(Van Etten *et al.*, 1989; Duncan and Burthem, 2003), DNA vazebné motivy (Kiptros And Wang, 1992; Duncan and Burthem *et al.*, 2003) a na C-konci proteinu aktin vazebné motivy (McWhirter and Wang, 1993; Duncan and Burthem, 2003).

2.4.3 Proto-onkogen a protein BCR

Lidský BCR gen se nachází na dlouhém raménku chromozomu 22 v pozici 11.23. C-konec proteinu BCR obsahuje oligomerizační doménu, SH2 vazebnou doménu (která zprostředkovává vazbu s proteiny obsahující SH2), dále serin/threonin kinázovou doménu, CalB doménu, která váže Ca^{2+} ionty a Rho/GEF a Rac/GAP, které regulují výmenu GDP za GTP a štěpení GTP na GDP u G proteinů (Duncan and Burthem, 2003)



Obr. 2 – Schéma lidských Bcr, Abl a Bcr-Abl proteinů.

a) Protein p160BCR: N-oligomerizační doména, SH2 vazebná doména. Dále Ser/Thr kináza, Rho/GEF doména, CaLB doména vážící vápník a C-Rac-GAP doména.

b) Protein p145Abl: N-SH domény. SH3 a SH2 domény. SH1 doména má tyrosinkinázovou funkci. Dále protein obsahuje jadernou lokalizační doménu, několik bohatých domén na prolin, DNA-vazebnou doménu a na C-konci aktin-vazebnou doménu.

c) Fúzní onkoprotein p210Bcr-Abl: Oligomerní doména na C-konci fúzního proteinu umožňuje SH1 doméně dimerizaci, autofosforylaci a tím konstitutivní aktivaci BCR-ABL1 kinázy (převazováno a upraveno dle: Duncan and Burthem, 2003).

2.4.4 Fúzní onkogen a onkoprotein Bcr-Abl

Fúzní gen BCR-ABL1 vzniká reciprokou translokací chromozomů 9 a 22. Předpokládá se, že iniciací translokace jsou dvouřetězcové zlomy DNA (dsDNA zlomy) na příslušných chromozomech, které jsou vyvolány endogenní chybou v buněčném jádře nebo působením exogenní agens (Agarwal *et al.*, 2006). Chybnou opravou těchto dsDNA zlomů v chromozomech vzniká výsledný fúzní gen. Zlomy v obou genech mohou vznikat na různých místech a vedou k tvorbě odlišných forem Bcr-Abl proteinu. Zatímco zlom v genu ABL1 se téměř vždy vyskytuje v rozsáhlé

oblasti prvního intronu, zlomy v genu BCR mohou vznikat na několika místech. Nejčastěji k tomu dochází v oblasti zvané major, což je úsek, který obsahuje introny 13 a 14 a mezi nimi ležící exon 14. Existují dvě varianty major-BCR e13a2 (obsahuje exony 1-13 BCR) a e14a2 (obsahuje exony 1-14 BCR), které kódují 210 kDa velký protein p210. Minor varianta e1a2, vyskytující se u malého procenta pacientů s CML, kóduje menší protein p190. U tzv. minor varianty dochází ke zlomu v BCR genu v oblasti prvního intronu (obsahuje z BCR pouze 1. exon). Vzácným typem přestavby je e19a2, vznikající zlomem BCR genu mezi exony 19 a 20, kóduje protein p230 (Faber *et al.*, 2010).

2.5 BCR-ABL1 signalizace

Bcr-Abl protein se nachází v cytoplazmě a ovlivňuje řadu signálních drah, jejichž aktivace následně vede k nádorové transformaci buňky. Mezi nejdůležitější z takto deregulovaných kaskád patří například JAK/STAT, MAPK a PI3K/AKT/mTOR signální dráhy.

2.5.1 MAPK signální dráha

Onkoprotein Bcr-Abl obsahuje vazebné místo pro protein GRB2, jehož prostřednictvím aktivuje signální kaskádu Ras/Raf/Mek/Erk, což vede k nekontrolované proliferaci (Mizuchi *et al.*, 2005).

2.5.2 PI3K/AKT/mTOR signální dráha

Bcr-Abl fosforyluje protein Crkl, který je následně schopen aktivovat PI3K/AKT signální dráhu ovlivňující další proteiny mTOR, FoxO či Bad, které jsou důležité pro přežití buňky (Faber *et al.*, 2010). Kináza mTOR (mammalian target of rapamycin) hraje důležitou roli v průchodu buněčným cyklem, proliferaci a buněčném růstu. Zvýšená stimulace této kinázy vede k nádorové transformaci (Hay *et al.*, 2004). Kináza mTOR aktivovaná proteinem Bcr-Abl zvyšuje produkci reaktivních forem kyslíku (ROS), které také hrají roli v transformaci buňky (Kim *et al.*, 2004). Dalším důležitým proteinem ovlivněným PI3K/AKT dráhou je protein Bad

patřící do skupiny proapoptických proteinů, a protein FoxO, který zabraňuje expresi proapoptotických genů. Aktivace PI3K/AKT dráhy vede k jejich inaktivaci, což přispívá k zvýšenému přežívání leukemických buněk (Brunet *et al.*, 1999; Virdee *et al.*, 2000; Hedema *et al.*, 2000).

2.5.3 JAK/STAT/(MYC) signální dráha

U zdravých buněk dochází k aktivaci dráhy přes cytokinový receptor, JAK kinázu a STAT transkripční faktory (TF). TF STAT1, STAT3 a STAT5 jsou v transformovaných buňkách konstitutivně fosforylovány nezávisle na aktivitě JAK díky kinázové aktivitě p210 resp. p190 Bcr-Abl, což vede ke deregulaci dráhy a zvýšené translokaci STAT proteinů do jádra. Zde aktivují přepis genů zapojených do buněčné proliferace a přežívání (antiapoptotický Bcl-Xl, CyclinD1) a podporují tak expanzi leukemických buněk. p190 navíc aktivuje i TF STAT6 (Carlesso *et al.*, 1996; Frank *et al.*, 1996; Ilria *et al.*, 1996). JAK2 kináza, aktivována proteinem Bcr-Abl, zvyšuje expresi protoonkogenu c-MYC a zároveň narušuje degradaci jeho proteinu v proteazomu (Shankai *et al.*, 2002). c-MYC je TF aktivující transkripci genů zapojených do proliferace, metabolismu a anti-apoptotických procesů v buňce. Bylo zjištěno, že c-MYC pozitivní zpětnou vazbou aktivuje expresi BCR-ABL1 v leukemických buňkách (Sharma *et al.*, 2015) a hraje klíčovou roli v rezistenci leukemických kmenových buněk CML (Abraham *et al.*, 2016).

edém, nízká hladina krevních destiček a neutrofilů (Druker *et al.*, 2001). Ačkoliv léčivo funguje ve všech fázích onemocnění, tak nejlepší účinnost prokazuje v chronické fázi. V roce 2003 O'Brien *et al.* publikovali klinickou studii IRIS (International Randomized Study of Interferon and STI571), která zahrnovala 1106 pacientů z 16 zemí a potvrdila, že imatinib je vhodnější a mnohem účinnější lék ve srovnání s dříve používanou kombinovanou léčbou interferonem- α a nízkodávkovaným cytarabinem. Tyto a další podobné studie potvrdily, že zaměření léčby na kauzální molekulární abnormalitu je úspěšnou strategií a že imatinib je vhodným lékem pro dlouhodobou léčbu CML, což dokazují výsledky několikaletého sledování pacientů s CML užívajících tento lék (Deininger 2009; O'Brien *et al.*, 2008).

2.6.2 Inhibitory II. generace

Ačkoliv je imatinib vhodným lékem pro léčbu CML, 20–30 % pacientů vykazuje na léčbu imatinibem v první linii primární nebo získanou rezistenci (Jabbour *et al.*, 2013). To vedlo k vývoji účinnějších inhibitorů II. generace, které jsou schopné zacílit i na některé mutované formy Bcr-Abl rezistentní k imatinibu.

2.6.2.1 Nilotinib

Nilotinib (dříve AMN107) je kompetitivní inhibitor kinázy Bcr-Abl s podobným mechanismem účinku, ale s vyšší afinitou vazby k proteinu a 20× vyšší účinností *in vitro* než má imatinib (O'Hare *et al.*, 2005; Weisberg *et al.*, 2006). Léčivo inhibuje i další kinázy jako je PDGFR, Kit, SCF-1R, DDR a ephrin-A4, ale s menší účinností, protože bylo vyvinuto na základě studia krystalické struktury komplexu ABL-imatinib (Faber *et al.*, 2010). Zároveň je účinný vůči některým mutovaným variantám BCR-ABL1 rezistentním k imatinibu (O'Hare *et al.*, 2005).

2.6.2.2 Dasatinib

Dasatinib (dříve BMS-354825) je selektivní kompetitivní inhibitor tyrosinových kináz BCR-ABL1, PDGF, c-Kit i kináz rodiny SRC (Weisberg *et al.*, 2006). Tento duální inhibitor je ve srovnání s imatinibem 325× účinnější *in vitro* a vhodný pro léčbu imatinib-rezistentních pacientů s mutovanou formou BCR-ABL1 kinázy, (O'Hare *et*

al., 2005). Dasatinib se váže na Bcr-Abl do nukleotidového vazebného místo pro ATP v aktivní i inaktivní konformaci enzymu a vykazuje menší vazebné požadavky než imatinib (Tokarski *et al.*, 2006)

2.6.2.3 Bosutinib

Bosutinib (SKI 606) je duální inhibitor ABL a SRC kináz, který je účinný vůči leukemickým klonům s mutovanou i nemutovanou variantou kinázy BCR-ABL1, opět s výjimkou mutace T315I (Cortes *et al.*, 2011). Oproti ostatním inhibitorům II. generace minimálně inhibuje c-Kit a PDGFR (Puttini *et al.*, 2006).

2.6.3 Inhibitory III. generace

I když II. generace TKI byla cílena na nemutované i mutované varianty proteinu BCR-ABL1, žádný z léčiv nebylo dosud dostatečně efektivní na mutaci T315I, na kterou se zaměřil výzkum TKI III. generace.

2.6.3.1 Ponatinib

Ponatinib, dříve známý jako AP24534, je silný TKI III. generace, který je účinný vůči všem mutovaným i nemutovaným formám BCR-ABL1, zejména proti mutaci T315I (O'Hare *et al.*, 2009). Je velice efektivní a vhodný pro léčbu ve všech fázích CML nebo při rezistenci na TKI první a druhé generace (Cortes *et al.*, 2010; Cortes *et al.*, 2013). Vykazuje však poměrně vysokou toxicitu.

2.6.4 Rezistence na léčbu TKI

I když v dnešní době existuje vhodná léčba pro CML, tak až u 20–30 % pacientů dochází k rozvoji rezistence na ni. Rezistenci můžeme dělit na primární a sekundární a dále podle odpovědi na molekulární, cytogenetickou a hematologickou. Primární rezistence je ta, kdy se nepodařilo navodit odpověď vůbec a sekundární ta, kdy po dosažení odpovědi došlo k její ztrátě (Žáčková *et al.*, 2012). Odpověď hematologická je definována počtem trombocytů ($<450 \times 10^9/l$), leukocytů ($<10 \times 10^9/l$), diferenciační rozpočet musí být bez zralých granulocytů a <5 % bazofilů (Penka *et al.*, 2011). Velká cytogenetická odpověď odpovídá zastoupení 0–35 % Ph+ klonu při cytogenetickém vyšetření a kombinuje kompletní

a parciální odpověď. Molekulární odpověď je vyšetřována kvantitativní real-time PCR z periferní krve a odpovídá poklesu hladiny BCR-ABL1 o 3 log a více (Baccarani *et al.*, 2013; Klamová, 2016).

2.6.4.1 Mechanismy rezistence nezávislé na BCR-ABL1

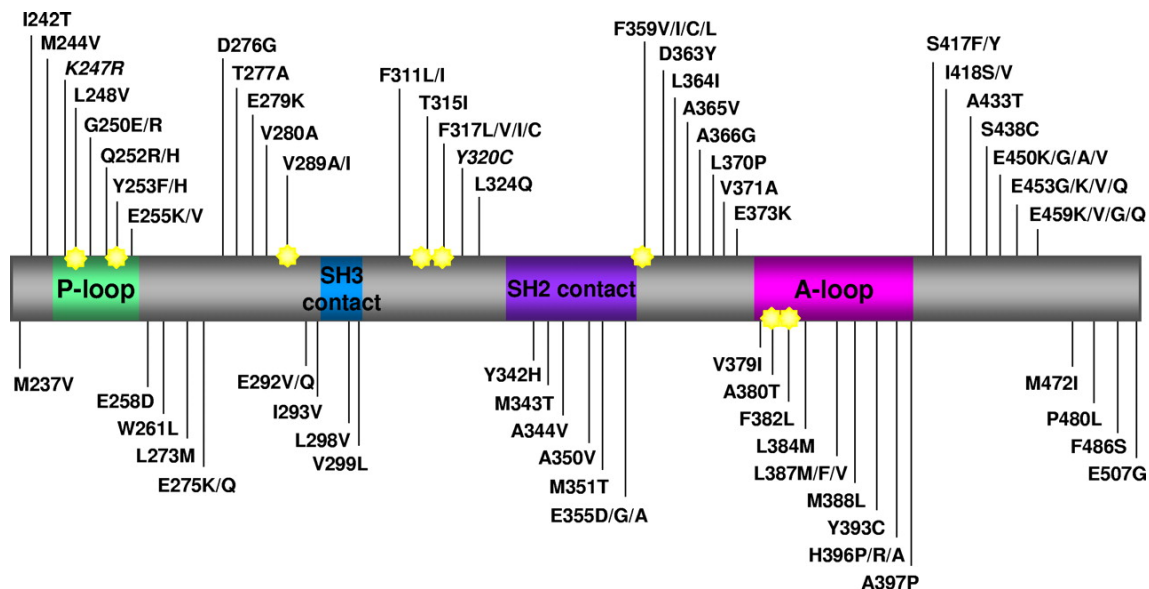
Mezi tyto mechanismy patří například snížený transport léčiva do buňky přes transportér hOCT-1 a zvýšený transport ven přes transporéty typu MDR-1 (Thomas *et al.*, 2004). Sníženou expresí transportéru hOCT-1 se nedostává dostatečné množství léčiva do buňky (Wang *et al.*, 2008). Dostupnost imatinibu ovlivňují polymorfismy v regulačních oblastech genů pro transportéry SLC22A4 a SLC22A5, které se účastní jeho transportu (Jarušková *et al.*, 2017). Přes transportér P-glykoprotein, kódovaný MDR-1, se léčivo dostává z buňky ven (Mahon *et al.*, 2003; Galimberti *et al.*, 2005). Důležitou roli hraje i hladina léku v plazmě, která může být ovlivněna například alfa-1-kyselým glykoproteinem (AGP), který váže léčivo a tak narušuje jeho biologickou aktivitu (Gambacorti-Passetini *et al.*, 2003; Rumpold *et al.*, 2005). Dalším možným mechanismem rezistence jsou epigenetické modifikace jako je methylace DNA, histonové modifikace, posttranslační úpravy či miRNA. Hypermethylace promotoru ABL1 je spojena s vývojem klonů a progresí onemocnění (Issa *et al.*, 1999). Dalším epigenetickým mechanismem je např. acetylace nehistonových proteinů p53, Ku70, Hsp90 (Lee *et al.*, 2007). Byla objevena i řada miRNA, které se rezistence účastní (San José-Enériz *et al.*, 2009). K rezistenci mohou přispívat další nově získané chromozomální aberace, které nejsou výjimečnou událostí (Hochhaus *et al.*, 2002).

2.6.4.2 Mechanismy závislé na BCR-ABL1

Mezi mechanismy závislé na aktivitě BCR-ABL1 řadíme zvýšenou expresi transkriptu BCR-ABL1, genovou amplifikaci (Mahon *et al.*, 2000, Campbell *et al.*, 2002) a mutace v genu BCR-ABL1. Nejčastější jednotlivou příčinou rezistence jsou právě mutace v BCR-ABL1 (Hochhaus *et al.*, 2002), které detailněji popisují v následující kapitole.

2.7 Mutace v kinázové doméně BCR-ABL1

Výskyt mutací v kinázové doméně BCR-ABL1 představuje významný mechanismus vzniku rezistence na TKI. TKI se nedokáže účinně navázat na mutovaný onkoprotein, leukemický klon získá v přítomnosti TKI proliferační výhodu a může způsobit relaps onemocnění. Avšak některé klony nesoucí určitou mutaci mohou mít nedostatečnou expresi proteinu BCR-ABL1, nebo sebeudržovací potenciál a k relapsu dojít nemusí (Lange *et al.*, 2005). V roce 2011 Soverini *et al.* vydali publikaci zaměřenou na různé mutace v KD na první TKI imatinib. Bylo nalezeno více než 90 různých aminokyselinových substitucí, které narušují či zcela ruší vazbu léku na kinázovou doménu. Za více než 70 % klinických případů mutačně podmíněné rezistence u pacientů s CML nicméně odpovídají záměny osmi aminokyselin v pozicích E250, Q252, Y253, E255, T315, M351, F359 a H396, přičemž 20 konkrétních záměn pak reprezentuje 85 % klinických případů rezistence spojené s mutacemi v KD BCR-ABL1 (Deininger *et al.*, 2005; Soverini *et al.*, 2011). U chronické fáze se mutace podílejí na rezistenci v 20 - 30 % případů, zatímco u blastické krize je to až 80 % (Soverini *et al.*, 2011). Typ mutace uděluje klonům různě silnou proliferační a leukemogenní výhodu proti klonům bez mutace v KD BCR-ABL1. Některé udělují tyto výhodu pouze v přítomnosti TKI a jiné i v jeho nepřítomnosti, tj. některé mutace zajišťují rezistenci na úkor sníženého transformačního a růstového potenciálu, zatímco jiné nikoliv. Mutace také mohou měnit spektrum cílů fosforylovaných BCR-ABL1 kinázou (Lange *et al.*, 2005; Griswold *et al.*, 2006).



Obr. 4 Mapa všech aminokyselinových substitucí v kinázové doméně BCR/ABL1, které byly identifikovány jako rezistentní na IM. P smyčka představuje vazebné místo pro ATP, SH2 a SH3 kontaktní doména je oblast kontaktu s proteiny obsahující SH2 a SH3 doménu a aktivací smyčka A, která reguluje svoji konformaci aktivaci kinázy (Převzato a upraveno dle Soverini et al., 2011).

I když rezistenci na imatinib vykazují celé spektrum mutací, nadějí byl vývoj TKI II. generace, u kterých je toto spektrum o mnoho menší. U dasatinibu to jsou mutace T315I, T315A, F317L, F317C, F317V a V299L a u nilotinibu to jsou mutace Y235H, T315I, E255V, E255K, F359V a L273M (Soverini et al., 2007; Soverini et al., 2009; Hughes et al., 2009). Mutační analýza před a po změně léčby pacientů s CML z imatinibu na TKI II. generace ukázala, že většina původních mutací po léčbě nebyla detekována. V některých případech se však nově objevily výše zmíněné rezistentní mutace (Soverini et al., 2009). V některém případě nicméně nejsou mutované klony nesoucí rezistenci na TKI selektovány, pravděpodobně z důvodu své omezené sebeobnovovací kapacity, nebo nepřítomnosti dalších BCR-ABL1-nezávislých rezistence potřebných mechanismů, pro dlouhodobé udržení leukemické hematopoézy (Willis et al., 2005; Khorashad et al., 2009).

2.7.1 Mutageneze BCR-ABL1 *de novo*

Rozvoj rezistence CML spojený s mutacemi v KD BCR-ABL1 je vysvětlován jednak modelem předpokládajícím pre-existenci mutovaných klonů, které jsou následně selektovány pod vlivem působení TKI a jejichž expanze je spojena se vznikem rezistentního fenotypu, tak pomocí modelu získávání mutací *de novo* po vystavení leukemických buněk TKI. Oba tyto modely se přitom vzájemně nevylučují (Chen *et al.*, 2011). Model preexistence a selekce mutovaných klonů předpokládá, že k mutacím dochází náhodně v průběhu přirozené evoluce CML. Pro tento model svědčí především detekovaná přítomnost mutací v KD BCR-ABL1 u pacientů s CML před zahájením léčby TKI, zejména ovšem u pacientů v akcelерованé a blastické fázi onemocnění (Shah *et al.*, 2002; Roche-Lestienne *et al.*, 2003) a rychlost relapsů stejně jako větší počet nezávislých klonů nesoucích mutace opět pozorovaný u pacientů s CML v blastické krizi (Shah *et al.*, 2002). Hypotézu selekce již existujících klonů podpořil také matematický model relapsu CML v důsledku rezistence na IM, způsobené rozvojem mutací BCR-ABL1 (Michor *et al.*, 2005). Vznik mutací v KD BCR-ABL1 je spojován se sebeustavením tzv. mutačního fenotypu v důsledku aktivity BCR-ABL1 kinázy. Bylo ukázáno, že BCR-ABL1 zvyšuje v buňkách hladinu reaktivních forem kyslíků (ROS), které způsobují jak mutace samotného BCR-ABL1 tak dalších genů a obecně chromosomovou nestabilitu. Tyto mutagenní účinky ROS je možné redukovat použitím antioxidantů (Kopytra *et al.*, 2006). Rovněž byl dokumentován vliv BCR-ABL1 na kumulaci dvouřetězcových zlomů DNA v buňce a zvyšování chybovosti oprav těchto poškození (Nowicki *et al.*, 2004; Dierov *et al.*, 2009).

Pro studium mutageneze u CML byla v posledních letech využita modelová buněčná linie KCL-22, která byla odvozená z nezralých nediferencovaných buněk od pacientky s CML v blastické krizi (Kubonishi and Miyoshi, 1983). Tyto studie přinesly zajímavé poznatky ve prospěch modelu *de novo* mutageneze. Na základě využití klonogenních esejí bylo ukázáno, že většina buněk nesoucích mutace BCR-ABL1 po vystavení IM nepochází z předem dané populace mutovaných nebo k mutacím predisponovaných buněk. Nativní lokus BCR-ABL1 vykazoval 10× vyšší mutagenní potenciál než cDNA BCR-ABL1 náhodně integrovaná do genomu ve

stejných buňkách (Yuan *et al.*, 2010). Vznik mutací v BCR-ABL1 po vystavení buněk působení IM vyžadoval expresi, ale nikoliv nutně aktivitu BCR-ABL1 a nekoreloval se zvýšenou frekvencí mutací v dalších genech (mutačním fenotypem). Po vystavení IM vznikaly v subklonech různé mutace *de novo* a frekvence vzniku mutací se výrazně snižovala s prodlouženou dobou kultivace buněk v kultuře (Yuan *et al.*, 2010). Dále bylo ukázáno, že získání mutace je velice rychlý proces, který je dokončen do tří dnů po vystavení buněk IM. Může být zablokován, pokud jsou buňky KCL-22 preventivně nebo současně s vystevním IM vystaveny také působení alltransretinové kyseliny (ATRA) s pro-diferenciačním účinkem (Wang *et al.*, 2014).

Deacetyláza SIRT1 je NAD⁺ dependentní epigenetický regulátor účastnící se epigenetických modifikací chromatinu a opravných mechanismů DNA. SIRT1 je nadměrně exprimována v CML buňkách a stimuluje způsob opravy DNA, který je náchylný k chybám vedoucím k mutacím. Inhibice této deacetylázy pomocí farmak i shRNA potlačila rozvoj rezistence a mutací v BCR-ABL1 (Wang *et al.*, 2013). ATRA inhibuje aktivitu SIRT1 tím, že silně zvyšuje expresi povrchového markeru a ektoenzymu CD38, který následně redukuje intracelulární hladinu NAD⁺, na němž je SIRT1 závislá (Wang *et al.*, 2014). Deacetyláza SIRT1 se mimo jiné účastní deacetylace a stimulace proteinu Ku70, který je jako součást heterodimeru Ku70/Ku80 klíčovým mechanismem k chybám náchylných oprav dvouřetězcových zlomů DNA cestou nehomologního spojování konců (NHEJ) (Fell *et al.*, 2012). Opačnou roli při regulaci reparace DNA a získání mutací má lysin specifická demethyláza LSD1, která se SIRT1 soutěží o vazbu na protein Ku70 a ovlivňuje strukturu chromatinu. Frekvence mutací je zvýšená inhibicí LSD1 a snižená inhibicí SIRT1 (Roth *et al.*, 2016). Další studie na buňkách KCL-22 ukázala, že buňky KCL-22 vystavené imatinibu snížily během mutageneze expresi serin/threoninové kinázy Aurora A, což vedlo k prvním známkám relapsu – morfologickým změnám. Poté, co iniciovaná buňka prošla počáteční mitózou, docházelo k obnově exprese Aurory A, obnově proliferace i původní morfologie. Inhibice Aurora A blokovala rozvoj mutací BCR-ABL1 a relaps buněk na TKI první i druhé generace (Yuan *et al.*, 2011). SIRT1 a Aurory A tedy pravděpodobně hrají roli při *de novo* získání mutací BCR-ABL1

a v rezistenci na TKI. Jejich inhibitory by mohly vést k překonání rezistence a zlepšení léčby CML.

2.8 Reparace DNA

K poškození DNA dochází v genomu denně vlivem mnoha endogenních a exogenních faktorů. Endogenními faktory rozumíme například zařazení chybné báze do vznikajícího řetězce DNA při replikaci nebo působení reaktivních forem kyslíku. Mezi exogenní řadíme chemické faktory (karcinogeny či interkalační činidla), biologické (viry) a fyzikální (UV a ionizující záření). V buňce se vyvinulo několik opravných mechanismů DNA, bez kterých by docházelo k nestabilitě genomu a ztrátě integrity DNA.

2.8.1 Odpověď na poškození DNA

DDR (DNA damage response), neboli odpověď na poškození DNA slouží k udržení stability genomu. Jedná se o přísně regulovanou síť buněčných procesů zahrnující zástavu buněčného cyklu, transkripční a posttranskripční aktivaci genů, které jsou spojeny s reparací DNA a za určitých podmínek spouští programovanou buněčnou smrt (Ciccio and Elledge, 2010; Khanna and Jackson, 2001). DDR se skládá ze tří hlavních součástí, které se mohou funkčně překrývat. Jde o senzory poškození, převodníky a efektory. Na úroveň senzorů řadíme kinázy ATM a ATR, které slouží k detekci poškození DNA a aktivaci příslušných reparačních kaskád. ATM je aktivován hlavně dvouřetězcovými zlomy DNA (DSB) a působí ve všech fázích BC. Oproti tomu ATR je aktivován hlavně jednořetězcovými zlomy (SSB). ATM i ATR dráhy jsou úzce spjaty a mohou aktivovat některé stejné cíle (Liang *et al.*, 2009). Pro aktivaci ATR a jeho partnerského proteinu ATRIP v místě poškození je nutný protein RPA, který se váže na konce SSB. Pro aktivaci celé dráhy indukované ATR jsou nezbytné další proteiny – ETAA1, TopBP1 a proteinové komplexy RAD9-HUS1-RAD1, RAD17-RFC (Blackford *et al.*, 2017). ATM je v DSB rekrutován a aktivován komplexem MRN. ATM fosforyluje histon H2AX a MDC1 a jeho aktivita se udržuje díky kináze c-ABL a proteinu KAT5. Komplex ATM-MRN dále fosforyluje

převodníky a efekторы v DDR, kterými jsou CHK2 nebo protein p53 (Blackfort *et al.*, 2017). Mezi převodníky poškození řadíme kinázy CHK1 a CHK2, které fosforylací přenášejí signály k efektorům. Mezi ty patří proteiny podílející se na opravě DNA, regulaci transkripce, replikace, kontroly buněčného cyklu a apoptózy. Jedná se například o BRCA1, NBS1, p53, FANCD2, H2AX či CDC25 (Zhou *et al.*, 2004).

2.8.2 Reparace DNA

Hlavním cílem reparace DNA je oprava daného poškození DNA. Neschopnost detekovat a opravit poškození DNA vede ke genetické nestabilitě a zvyšuje riziko rakoviny. Reparace DNA zahrnuje několik základních procesů, mezi které patří oprava špatně inkorporované báze (mismatch repair), přímá oprava DNA, opravy vystřižení báze (BER), opravy vystřižení nukleotidů (NER) a oprava jednořetězcových (SSB) a dvouřetězcových zlomů DNA (DSB). Mezi základní mechanismy DSB patří homologní rekombinace (homologous recombination, HR), nehomologní spojování konců (non-homologous end joining, NHEJ) a méně známe MMEJ (microhomology-mediated end-joining) a SSA (single-strand annealing) (Khanna *et al.*, 2001)

2.8.2.1 Oprava vystřižením báze (BER)

Prvním krokem BER je rozpoznání a excize abnormální báze v DNA. Toto je úkolem DNA glykosylázy, kterých v buňce existuje mnoho druhů. V tomto procesu dále dochází k přetržení řetězce AP endonukleázou, jeho dosyntetizování DNA polymerázou β a spojení DNA ligázou III (shrnutí v Sung and Demple, 2006; David *et al.*, 2007).

2.8.2.2 Oprava vystřižením nukleotidů (NER)

NER je vícestupňový proces rozpoznávající široké spektrum poškození, které je způsobeno například UV zářením či působením chemických aduktů a eliminující tyto poškození excizí 24–32 nukleotidů z poškozeného řetězce (shrnutí v Jackson and Bartek, 2009). Následně dochází k dosyntetizování vlákna za použití templátu a k ligaci dvou vláken. NER můžeme dělit do dvou kategorií z hlediska počátečního rozeznání škod. První, GG-NER (global genomic NER), detekuje a eliminuje

poškození v celém genomu, včetně netranskribovaných úseků. Tento pomalý proces kontroluje celý genom. Oproti tomu TC-NER (transcription coupled NER) je rychlý proces zaměřující se na opravu transkribujícího vlákna, kde poškození zabraňuje chodu transkripce. GG-NER je rozpoznán proteinovým faktorem XPC a TC-NER je aktivováno díky zastavené RNA polymeráze II (shrnutí v Petruseva *et al.*, 2014).

2.8.2.3 Homologní rekombinace (HR)

HR je proces, který probíhá v S nebo G2 fázi buněčného cyklu a vyžaduje přítomnost homologní sekvence. V místě dvouřetězcového zlomu dochází k navázání proteinového komplexu MRE11-Rad50-NSB1 neboli MRN. MRN působí jako marker poškození DNA a opracovává konce zlomu za vzniku přesahujících 3'konců, na které se z důvodu jejich ochrany následně váže RAD52. RAD52 interaguje s dalšími proteiny RAD51 a RPA důležitými pro invazi homologních vláken a syntéze DNA podle templátového vlákna. Ke spojení vláken je opět nutná DNA ligáza (shrnutí v Christmann *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2005; Xiun and Heyer, 2008).

2.8.2.4 Nehomologní spojování konců (NHEJ)

NHEJ je typem opravy DNA, která probíhá bez nutnosti homologního vlákna. Heterodimer Ku70(XRCC6)/Ku80(XRCC5) se váže na konce DSB, iniciují opravu a slouží k navázáním dalších proteinů potřebných k NHEJ. Ku70/Ku80 tvoří komplex s velkou katalytickou podjednotkou (DNA-PKcs) za vzniku DNA-dependentní kinázy (DNA-PK) (Fell *et al.*, 2012; Jette *et al.*, 2015). Následně nukleáza Artemis odstraňuje jednovláknové přesahy na koncích DSB. Posledním krokem je ligace zprostředkovaná komplexem proteinu XRCC4/ligáza IV, se kterým interaguje komplex XLF. V jeho nepřítomnosti dochází ke snížené účinnosti celého procesu (shrnutí v Meek *et al.*, 2008).

3 Hypotéza a cíle diplomové práce

Na základě výsledků uvedených v Přehledu literatury (Kapitola 2.7.1.) a vlastních, dříve dosažených výsledků pracoviště školitele byla stanovena hypotéza, že v procesu *de novo* akvizice mutací v KD BCR-ABL1, který byl identifikován v buňkách KCL-22, budou hrát roli geny, jejichž produkty se účastní reakcí buňky na poškození DNA a jejich oprav.

1. Hlavním cílem diplomové práce bylo identifikovat pomocí RT² Profiler PCR Arrays mezi geny zapojenými do odpovědi buněk na poškození DNA a jejich oprav takové, u kterých lze na základě změn exprese v průběhu navození rezistence na TKI a získání mutací předpokládat, že se na těchto procesech svojí deregulací podílejí.

Díličními cíly diplomové práce bylo:

2. Charakterizovat proliferační schopnosti a citlivost buněk KCL-22 k imatinibu v závislosti na stáří buněčné kultury a na expresi molekuly CD38, jejíž vztah k mutagenезi byl nastíněn v Přehledu literatury (Kapitola 2.7.1.).

3. Pomocí metody RT-qPCR určit roli exprese BCR-ABL1 v mutagenезi KCL-22.

4 Materiál a metody

4.1 Laboratorní přístroje a reagenty

Tab. 1 Použité přístroje

Přístroj	Výrobce
Rotor Gene PCR cyklér	Quiagen
Termocyclér TRIO	Biometra
Termocyclér TA 96G	Biometra
Chameleon Multilabel Microplate Reader	Lab Logic Systém Ltd.
StepOnePlus RT-qPCR systém	ThermoFisher Scientific
FACS Aria III	Becton Dickinson
Facs Canto II	Becton Dickinson
Mikroskop Olympus CKX41	Olympus
MCO inkubátor CO ₂	Panasonic
CellCounter – počítač buněk	Bio-Rad
Herasafe KS laminární box	ThermoFisher Scientific

Tab. 2 Použité reagenty, roztoky a kity a jejich charakteristika

Použité reagenty a roztoky	Charakteristika (výrobce)
Trizol® Reagent	Monofázický roztok genolu a guanidin thiokyanátu využívaný pro lýzu buněk a izolaci RNA (ThermoFisher Scientific)
10x ředěný glykogen	Nosič nukleových kyselin zlepšující výtěžek izolované RNA. Glykogen o koncentraci 20 mg/ml byl naředěn 10x vodou RNA kvality na koncentraci 2 mg/ml (ThermoFisher Scientific)
Chloroform + izoamylalkohol	Roztok pro rozdělení fází při centrifugaci na DNA, RNA a proteiny. Do 98 ml chloroformu (Merck) byly přidány 2 ml izoamylalkoholu (Merck), aby vznikl roztok v poměru 49:1
Izopropanol	Slouží k vysrážení RNA z vodné fáze (Merck)
75 % Etanol	Použit k promytí RNA od zbytku izopropanolu. 75 % etanol byl připraven z 11 ml vody RNA kvality a 39 ml 96% etanolu (Merck)
Nuclease-Free Water	Dále jako „voda RNA kvality“. Sterilní voda bez nukleáz používaná téměř u všech reakcí (ThermoFisher Scientific)
Směs dNTP (10 mM)	Směs deoxyribonukleotidů, které se inkorporují při elongaci (Promega)
RT 5x reaction Buffer	250mM Tris-HCl (pH 8.3 at 25°C), 375mM KCl, 15mM MgCl ₂ , 50mM DTT. Pufr je důležitý pro správné fungování reakce. (ThermoFisher Scientific)

RNasin (40 U/μl)	Rekombinatní lidský protein produkovaný v E.coli. Jedná se o silný inhibitor RNáz (ThermoFisher Scientific)
M-MLV (200 U/μl)	Rekombinantní DNA polymeráza, která syntetizuje komplementární řetězec DNA (ThermoFisher Scientific)
M-MLV Pufr (5x)	Pufr vytváří optimální podmínky pro průběh reakce. (ThermoFisher Scientific)
MgCl₂ (25 mM)	Vodný roztok chloridu hořečnatého filtrovaného přes 0,22 μm membránu, který se používá pro optimalizaci koncentrace hořčíkových iontů v reakci (ThermoFisher Scientific)
FastStart Taq polymeráza (5U/μL)	Termostabilní rekombinační Taq DNA polymeráza, která je aktivována 2-4 minutovým tepelným aktivačním krokem při +95 °C (Sigma-Adrich)
Hexamery (100 μM)	Jedná se o nespecifické 6 dlouhé oligonukleotidy, které se vážou na mRNA (Jena Bioscience)
Anexin V – APC	Váže se na buňky procházející apoptozou, a tím umožňuje jejich detekci. (Biolegend)
Annexin V Binding buffer (10x)	Pufr umožňující díky přítomnosti Ca ²⁺ iontů vazbu annexinu na fosfatidylserin. (Biolegend)
Quick cell proliferation colorimetric assay kit	Kit k měření buněčné proliferace (BioVision)
MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazoliumbromid používající se k stanovení metabolické aktivity resp. viability buněk v závislosti na působení (ThermoFisher Scientific).
PBS	Fosfátový pufr, který se používá ke stabilizaci acidobazické rovnováhy. Jedná se o fosfátový roztok s 0,15 M NaCl.
Roztok HCl+SDS	
RPMI-1640	Růstové médium pro buňky KCL-22 (ThermoFisher Scientific)
Fetal Bovine Serum	Růstový suplement, přidává se k médiu (10 % celkového objemu) (ThermoFisher Scientific)
Penicillin Streptomycin Solution	Směs antibiotik pro kultivaci buněčných linií. Používá se 1 % celkového objemu (Sigma)

Tab. 3 Použité primery a sondy

Primery a sondy
Primery jsou specifické oligonukleotidy, které nasedají na specifickou sekvenci a slouží pro syntézu řetězce DNA při PCR. Jsou dodávány v lyofilizovaném stavu a rozpuštěny ve vodě RNA kvality
BCR-ABL F (forward): 5'- TCCGCTGACCATCAATAAGGA-3'
BCR-ABL R (reverse): 5'- CACTCAGACCCTGAGGCTCAA -3'
GUS F (forward): 5'- GAAAATATGTGGTTGGAGAGCTCATT-3'
GUS R (reverse): 5'- CCGAGTGAAGATCCCCTTTTTA-3'
BCR-ABL proba (sonda): 5'- FAM-CCCTTCAGCGGCCAGTAGCATCTGA -BHQ1-3'
GUS proba (sonda): 5'-FAM- CCAGCACTCTCGTCGGTACTGTTCA -BHQ1-3'

4.2 Použitá buněčná linie

Buněčná linie KCL-22 byla odvozena z pleurálního výpotku pacientky s chronickou myeloidní leukemií v blastické krizi. Buňky s hyperdiploidním karyotypem s 3,3 % polyploidnie – 51(47-51) $<2n>$ nesou 2 Philadelfské chromozomy exprimující fúzní protein variantu e13-a2 (b2-a2) BCR-ABL1 a rovněž nesou mutaci v genu TP53 na 17 chromozomu. Buňky byly pořízeny z biobanky Leibnitz Institute – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ – ACC 519), která také provedla jejich verifikaci. V práci jsme využili časnou (<20 pasáží) a pozdní kulturu (>150 pasáží) buněk KCL-22.

4.3 Použité klony a jejich mutační charakteristika

Klony byly připraveny sortováním po 1 buňce pracovištěm Childhood Leukemia Investigation Prague (CLIP) působícím v rámci Kliniky dětské hematologie a onkologie 2. LF UK a FN Motol. Do 96 jamkových desek s médiem bez IM resp. s médiem s 0,0004 μM IM; 0,004 μM IM; 0,04 μM IM a 0,4 μM IM byly na základě exprese povrchového znaku CD38 sortovány CD38+ a CD38- buňky KCL-22. K sortování byl využit průtokový cytometr BD FACS Aria III a výsledky byly vyhodnoceny na software BD FACS Diva Software verze 6.1.3. Klony vycházející z časně kultury, které přežily přesazení do 4 μM IM, byly konzultantkou mojí diplomové práce, Mgr. Václavou Polívkovou (ÚHKT) analyzovány na přítomnost mutací v KD BCR-ABL1 pomocí Sangerova sekvenování a citlivější metodou Next-Generation-Sequencing (NGS). Ve 3/4 klonech rezistentních na 4 μM IM pocházejících z časně kultury bylo detekováno získání mutace v KD BCR-ABL1. U klonu B8 byla nalezena mutace T315I, u klonu B10 mutace Y253H, a u klonu F4 mutace E255K. 1/4 CD38- klonů (E4) vyvinul rezistenci na 4 μM IM bez přítomnosti mutací (Tab. 4).

Tab. 4 Vývoj *de novo* mutací u klonů KCL-22 z časné kultury – B8-T315I, B10-Y253H, E4-WT a F4-E255K – detekovaný pomocí Sangerova sekvenování a NGS

Počet dní/ koncentrace IM	21den 0,004 μM IM	28den 0,004 μM IM	45den 0,4 μM IM	60den 0,4 μM IM	75den 0,4 μM IM	90den 4 μM IM	120den 4 μM IM
Klon B8 (CD38-)	wt	wt	wt	T315I 1,9 %	T315I 44 %	T315I 50 %	T315I 50 %
Klon B10 (CD38)	wt	wt	wt	wt	Y253H 2 %	Y253H 30 %	Y253H 30 %
Klon E4 (CD38-)	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt
Klon F4 (CD38-)	wt	wt	wt	E255K 0,8 %	E255K 54 %	E255K 50 %	E255K 50 %

4.4 Kultivace buněčných linií a klonů

Buněčná linie KCL-22 a z ní odvozené klony byly kultivovány v médiu RPMI-1640 v objemu 10 ml v kultivačních lahvičkách 25 cm² nebo na 96 a 24 jamkových destičkách a uchovávány v inkubátoru při 37 °C a 5 % CO₂. Kultivace probíhala v médiu bez imatinibu, případně v médiu s 0,004 μM IM; 0,4 μM IM nebo 4 μM IM.

4.5 Pasáž buněk a klonů KCL-22

Pasáž buněk byla u dobře narostlých kultur prováděna jedenkrát týdně v poměru 1:9 v laminárním boxu. 9 ml čerstvého média RPMI-1640 bez IM/s určitou koncentrací IM ze zásobní lahve bylo přidáno do nové kultivační lahvičky 25 cm². Do takto připraveného čerstvého média RPMI-1640 byl nasazen 1 ml suspenze původní kultury s buňkami KCL-22. Pasáž buněčných klonů v 96 a 24 jamkových destičkách byla prováděna podobným způsobem, ale v poměru 1:2. Do nové destičky bylo přidáno 2 ml média s různými koncentracemi IM a 1 ml původní suspenze.

4.6 Izolace RNA

Postup uplatněný při izolaci RNA je součástí Standardního operačního postupu „SOP04 Molekulární monitorování transkriptu BCR-ABL“ (NRL_04_SOP_14_01) Komplementu laboratoří ÚHKT. Před samotnou izolací RNA byla provedena lýza buněk KCL-22 kultivovaných v médiu bez IM / v různých koncentracích IM. Objem 1 ml buněčné suspenze s médiem byl přenesen do 1,5 ml mikrozkuhavky (Eppendorf) a centrifugován při pokojové teplotě (5 min, 800 g). Následně byl slit supernatant, přidán 1 ml Trizol® Reagent, celý vzorek krátce promíchán a inkubován 15 minut při laboratorní teplotě. Během inkubace byl vzorek dvakrát krátce promíchán. Následně bylo do směsi přidáno 10 µl 10× ředěného glykogenu. Do roztoku bylo přidáno 200 µl chloroformu s izoamylalkoholem v poměru 49:1, promícháno 15 s a inkubováno 5 minut při laboratorní teplotě. Po inkubaci následovala centrifugace (15 min, 12000 g, 4 °C). Do čistých mikrozkuhovek bylo přepipetováno 500 µl bezbarvé horní vodné fáze ustavené pro centrifugaci a 500 µl izopropanolu. Roztok byl inkubován 30 minut při -20 °C a následně centrifugován (10 min, 12000 g, 4 °C). Následně byl slit supernatant a mikrozkuhavka otřena o sterilní filtrační papír. K sedimentu bylo přidáno 1000 µl 75 % etanolu a centrifugováno (8 min, 10000 g, 4 °C). Supernatant byl opět slit a mikrozkuhavka otřena o filtrační papír pro odstranění veškeré tekutiny. K sedimentu bylo přidáno 30 µl vody RNA kvality a izolovaná RNA se nechala rozpustit 10 minut při 55 °C.

4.7 RT-qPCR

Postup uplatněný při RT-qPCR je součástí Standardního operačního postupu „SOP04 Molekulární monitorování transkriptu BCR-ABL“ (NRL_04_SOP_14_01) Komplementu laboratoří ÚHKT. Real-time kvantitativní PCR byla použita pro kvantifikaci hladiny transkriptu fúzního genu BCR-ABL1 v návaznosti na izolaci celkové buněčné RNA (kapitola 4.6). Z vyizolované RNA byla nejprve reverzní transkripce připravena cDNA (komplementární DNA). Pro reverzní transkripci byl připraven reakční roztok (master mix) dle rozpisu (Tab. 5).

Tab. 5 Mastermix – reverzní transkripce

Reakční roztok pro 1 vzorek	Objem	Pozn.
Voda RNA kvality	4,0 µl	Před použitím rozmrazeno a promícháno
RT 5x pufr	4,0 µl	Před použitím rozmrazeno a promícháno
Směs dNTP	1,0 µl	Před použitím rozmrazeno a promícháno
RNasin (40 U/ µl)	1,0 µl	Teplota – 18 °C
M-MLV (200 U/ µl)	1,0 µl	Teplota – 18 °C

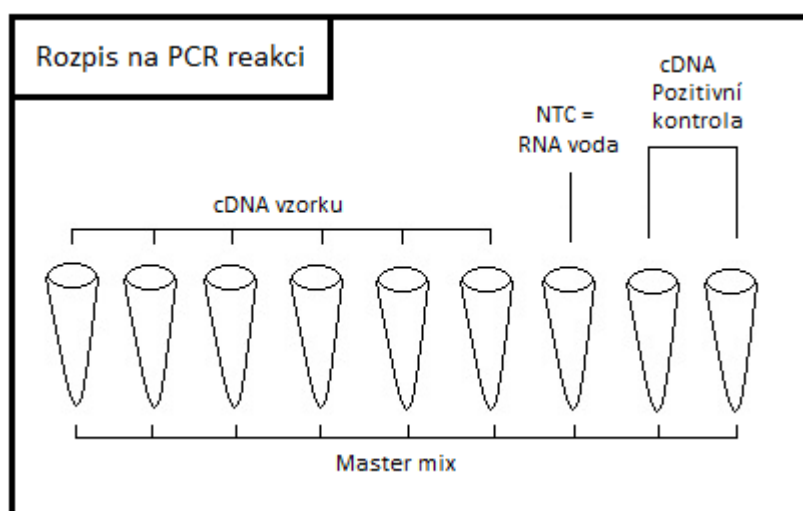
Do připravených mikrozkušavek (Eppendorf) byl napipetován 3 µl hexamerů (100 µM) a 6,0 µl RNA ze vzorků. Roztok byl promíchán, centrifugován na mikrocentrifuze a inkubován 5 minut při 70 °C v termocyleru (Biometra TRIO). Do mikrozkušavek bylo přidáno 11 µl master mixu (Tab. 5) a následně inkubováno v termocyleru (60 minut při 37 °C; denaturace 3 minuty při 94 °C a závěrečné zchlazení při 4 °C. Nakonec bylo k 20 µl cDNA přidáno 5 µl vody RNA kvality. Po reverzní transkripci proběhla kvantifikace množství mRNA v reálném čase (qPCR). K amplifikaci byly použity specifické primery a míra exprese transkriptu BCR-ABL1 byla určena na základě srovnání s kontrolním genem β-glukoronidázy (GUS). Tato metoda využívá systém TaqMan. Jedná se o specifické hydrolizační sondy, krátké oligonukleotidy, fluorescenčně značené na obou koncích. Na 5' konci se jedná o zářič a na 3' konci o zhášec, které jsou na základě 5'→3' exonukleázové aktivity *Taq* polymerázy uvolněny z cílové sekvence cDNA. Tak dojde k oddálení zářiče a zhášeče a ukončení efektu zhášení. Vznikající fluorescence je měřena v průběhu elongační fáze každého cyklu PCR.

Tab. 6 Mastermix RT-qPCR

Reakční roztok pro 1 vzorek	Objem	Pozn.
Voda RNA kvality	11,7 µl	Před použitím rozmrazeno a promícháno
Pufr	2,5 µl	Před použitím rozmrazeno a promícháno
MgCl ₂ (25 mM)	4,0 µl	Před použitím rozmrazeno a promícháno
dNTP (10 mM)	0,50 µl	Před použitím rozmrazeno a promícháno
Primer forward (20 µM)	0,375 µl	Před použitím rozmrazeno a promícháno
Primer reverse (20 µM)	0,375 µl	Před použitím rozmrazeno a

TaqMan sonda (20 μM)	0,31 μ l	promícháno Před použitím rozmraženo a promícháno
FastStart Taq polymeráza (5U/μL)	0,25 μ l	Teplota – 18 °C

Reakce byla provedena v 0,1 ml stripech, do kterých bylo dle rozpisu (Obr. 5) přidáno 20 μ l mastermixu (Tab. 6), 5 μ l RNA vody, po 5 μ l cDNA vzorků, pozitivních a negativních kontrol (NTC). Připravené stripy byly vloženy do přístroje Rotor-*Gene* Q a spuštěn amplifikační program. Iniciační amplifikace proběhla 10 minut při 95 °C, následovalo 45 cyklů (15 s při 95 °C, 1 minuta při 60 °C) v opakování. Jako pozitivní kontroly byly použity lyzáty BCR-ABL1 pozitivní buněčné linie K562. Pozitivní kontrola 1 byla připravena jako cDNA s hladinou BCR-ABL \geq 5 % a pozitivní kontrola 2 jako cDNA s hladinou BCR-ABL \leq 0,5 %. Jako negativní kontrola (NTC) byla použita voda RNA kvality.



Obr 5. Rozpis na RT-qPCR reakci.

4.8 Měření proliferace

Z buněčné kultury/klonů byla odebrána suspenze v objemu 1 ml do 1,5 ml mikrozkuhavky (Eppendorf), která byla stočena při 800 g, 5 minut. Následně byl odlit supernatant a peleta buněk byla resuspendována v 1 ml PBS. Z připravené suspenze bylo odebráno 10 μ l a přidáno k 190 μ l trypanové modře a homogenizováno na vortexu. Následně bylo odebráno 10 μ l na počítací sklíčko

a spočítáno na měřiči buněk TC20 Automated Cell Counter. Nasazení buněk probíhalo ve 24 jamkových deskách, v duplikátech od každého vzorku. Do každé jamky se přidalo 500 μ l média s požadovanou koncentrací IM a 500 μ l suspenze, ve které bylo 100 000 buněk s požadovanou koncentrací IM. Měření proběhlo po nasazení v časových bodech 72 hodin, 96 hodin a 120 hodin, z každé jamky v technických duplikátech. Z nasazených buněk z 24 jamkové desky bylo v době měření odebráno 90 μ l suspenze do 96 jamkové desky, k té přidáno 10 μ l ECS a do posledních jamek 100 μ l PBS a 100 μ l negativní kontroly. Negativní kontrola se skládala z 90 μ l média bez buněk a 10 μ l ECS. Takto připravená deska byla inkubována 2 hodiny při 37 °C. Absorbance byla následně měřena na čtecím zařízení přístroji Chameleon Multilabel Microplate Reader při vlnové délce 450 nm.

4.9 Měření apoptózy

Pro měření viability buněk byl použit Annexin V, konjugovaný s fluorescenční barvou APC (Allofukokyanin). Annexin V je vysokoafinitní ke strukturám obsahující fosfatidylserin. Fosfatidylserin se nachází ve vnitřním listě plasmatické membrány a během ranných fází apoptózy se z vnitřního listu přesouvá na vnější. Takto lze definovat populace buněk, které prochází (časnou) apoptózou. Po spočítání buněk byl následně objem suspenze s $0,5 \times 10^6$ buněk napipetován do měřících kyvet advakrát promyt Annexin vazebným pufrům (1x). Ve zbytkovém objemu bylo přidáno 0,8 μ M Annexinu V – APC a kyveta inkubována 15 minut ve tmě a chladu. Dalším krokem bylo promytí buněk PBS jako u měření proliferace (kapitola 4.8). Vytvořená peleta buněk byla resuspendována v 1 ml PBS s albuminem a následně měřena na průtokovém cytometru BD FACS Canto II. Krátce před měřením byl do zkumavky přidán 1 μ l interkalačního činidla propidiumjoidu, který barví pozdně apoptotické a nekrotizující buňky. Získané výstupy byly analyzovány s pomocí programu FACSDiva software v 6.1.

4.10 MTT assay

MTT test slouží ke stanovení počtu a viability buněk na základě detekce jejich metabolické aktivity. Mitochondriální enzymy dýchacího řetězce redukují přidané MTT (3-[4,5-dimetylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid) na fialové krystalky formazanového derivátu. Krystalky zůstávají uvnitř buněk v nerozpustných granulích. Následně pomocí detergentu dojde k rozpuštění krystalek a uvolnění barviva z buněk. Měřením absorbance byla stanovena metabolická aktivita buněk, která odráží množství živých buněk v kultuře. Nasazení buněk probíhalo ve 24 jamkových deskách, v duplikátech od každého vzorku. Do každé jamky se přidalo 500 μ l média bez fenolové červeně s požadovanou koncentrací IM a 500 μ l suspenze s požadovanou koncentrací IM, ve které bylo 100 000 buněk. Příprava na měření buněk proběhla po 72 hodinách. Do 96 jamkové desky bylo napipetovalo 100 μ l buněčné suspenze + 10 μ l roztoku s MTT a deska byla inkubována 4 hodiny při 37 °C. Po inkubaci byly pozorovány v jamkách fialové krystalky, které byly rozpuštěny detergentem, roztokem kyseliny chlorovodíkové a SDS. Následně proběhla druhá inkubace přes noc při 37 °C a absorbance byla změřena následující den na Chameleon Multilabel Microplate Reader při vlnové délce 570 nm.

4.11 RT² Profiler PCR Arrays

RT² Profiler PCR arrays bylo použito ke změření míry exprese vybraných genů účastníků se signalizace na poškození DNA a jejich oprav. Tato metoda je založena na Real-time PCR systému s použitím interkalační činidla SYBR Greenu, který se v každém cyklu amplifikace preferenčně váže na dvouřetězcovou DNA. V návaznosti na izolaci RNA (kapitola 4.6) bylo 100 μ g vyizolované RNA přidáno ke 2 μ l Buffer GE a dále byla přidána RNA voda tak, aby celkový objem činil 10 μ l. Mikrozkušavka byla inkubována 5 minut při 42 °C v termocycleru Biometra TA 96G a nechána 1 minutu na ledě. Tím byla ze vzorku eliminována případná genomická DNA. Následně byl připraven mastermix pro reverzní transkripci (Tab. 7.) a přidán po 10 μ l do každého vzorku. Reakce byla inkubována na 42 °C přesně 15 minut

a okamžitě zastavena inkubací na 95° C po dobu 5 minut. Do každé reakce bylo přidáno 91 µl RNA vody.

Tab. 7 Mastermix – reverzní transkripce přes kolony

Reakční roztok pro 1 vzorek	Objem	Pozn.
Voda RNA kvality	3 µl	Před použitím rozmraženo a promícháno
5x Buffer BC3	4 µl	Před použitím rozmraženo a promícháno
Control P2	1 µl	Před použitím rozmraženo a promícháno
RE3 Reverse Transcriptase Mix	2 µl	Teplota – 18 °C

Následně byl připraven mastermix (Tab. 8), který byl po 25 µl rozpipetován do 96 jamkové desky obsahující specifické primery pro různé geny účastníci se signalizace poškození a reparace DNA. Rozpis genů pro RT² Prolifer PCR Array Human DNA Damage Signaling Pathway (Tab. 9) a pro RT² Prolifer PCR Array Human DNA Repair (Tab. 10) jsou uvedeny níže. Na desku byla vložena krycí folie, deska byla vložena do přístroje StepOne Plus (ThermoFisher Scientific) a spuštěn amplifikační program: 1 cyklus 10 minut 95 °C a následně 40 cyklů (15 s 95 °C; 1 min při 60 °C).

Tab. 8 Mastermix – PCR Arrays

Reakční roztok 96 vzorků	Objem	Pozn.
Voda RNA kvality	1248 µl	Před použitím rozmraženo a promícháno
2X RT2 SYBR Green Mastermix	1350 µl	Před použitím rozmraženo a promícháno
cDNA	102 µl	Před použitím rozmraženo a promícháno

Pro vyhodnocení surových dat (hodnot C_t, průběhu křivek tání) z PCR, nastavení trasholdu a dalších parametrů byl použit StepOne Plus software. Byla provedena analýza průběhu křivek tání (zachycujících hodnoty fluorescence v závislosti na teplotě) a z analýz byly vyloučeny geny, jejichž derivovaná křivka tání vykazovala zřetelně více než jeden vrchol a/nebo kde křivka dosahovala vrcholu při teplotě nižší než 75 °C, což v obou případech svědčí o nespecifitě detekovaného produktu PCR. Výsledky měření exprese analyzovaných genů byly normalizovány na průměr

Ct hodnot 4 kontrolních genů obsažených v kitu (B2M, GADPH, RLP0, HPRT). Aktin (ACT) byl jako kontrolní gen z hodnocení vyřazen, protože změny jeho exprese ve zvolených časových bodech se výrazně odlišovaly od ostatních kontrolních genů anedalo se vyloučit, že jeho exprese se v průběhu experimentu měnila. Hodnocení genové exprese bylo prováděno metodou $\Delta\Delta CT$. U jednotlivých genů byla stanovená hodnota změny exprese v testované vůči kontrolní skupině – v násobcích, fold change (FC) = $2^{-\Delta\Delta CT}$, kde za signifikantní změnu exprese byl považován FC < 0,5 nebo FC > 2. Do výsledkových tabulek byla pro názornost uvedena hodnota „Fold regulation“, která hodnoty FC <1 převádí na převrácené číslo se záporným znaménkem (např. FC = 0,5 převede na hodnotu -2)

Tab. 9 Rozpis specifických genů účastnících se signalizace poškození DNA v 96 jamkové desce

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ABL1	APEX1	ATM	ATR	ATRIP	ATRX	BARD 1	BAX	BBC3	BLM	BRCA 1	BRIP1
B	CDC25 A	CDC25 C	CDK7	CDKN1 A	CHEK1	CHEK 2	CIB1	CRY1	CSNK2A 2	DDB1	DDB2	DDIT 3
C	ERCC1	ERCC2	EXO1	FANCA	FANCD 2	FANC G	FEN1	GADD45 A	GADD45 G	H2AF X	HUS1	LIG1
D	MAPK1 2	MBD4	MCPH 1	MDC1	MLH1	MLH3	MPG	MRE11A	MSH2	MSH3	NBN	NTHL 1
E	OGG1	PARP1	PCNA	PMS1	MPS2	PNKP	PPM1 D	PPP1R15 A	PRKDC	RAD1	RAD1 7	RAD1 8
F	RAD21	RAD50	RAD5 1	RAD51 B	RAD9A	RBBP 8	REV1	RNF168	RNF8	RPA1	SIRT1	SMC1 A
G	SUMO1	TOBPB 1	TP53	TP53BP 1	TP73	UNG	XPA	XPC	XRCC1	XRCC 2	XRCC 3	XRCC 6
H	ACTB	B2M	GAPD H	HPRT1	RPLP0	HGDC	RTC	RTC	RTC	PPC	PPC	PPC

Tab. 10 Rozpis specifických genů účastnících se oprav DNA v 96 jamkové desce

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	APEX1	APEX2	ATM	ATR	ATXN 3	BRCA 1	BRCA 2	BRIP1	CCNH	CCNO	CKD7	DDB1
B	DDB2	DMC1	ERCC 1	ERCC2	ERCC 3	ERCC4	ERCC 5	ERCC6	ERCC8	EXO1	FEN1	LIG1
C	LIG3	LIG4	MGM T	MLH1	MLH3	MMS1 9	MPG	MRE11 A	MSH2	MSH3	MSH4	MSH5
D	MSH6	MUTY H	NEIL1	NEIL2	NEIL3	NTHL 1	OGG1	PARP1	PARP2	PARP 3	PMS1	PMS2
E	PNKP	POLB	POLD 3	POLL	PRKD C	RAD1 8	RAD2 1	RAD23 A	RAD23 B	RAD5 0	RAD5 1	RAD51B
F	RAD51 C	RAD51 D	RAD5 2	RAD54 L	RFC1	RPA1	RPA3	SLK	SMUG1	TDG	TOP3 A	TOP3B
G	TREX1	UNG	XAB2	XPA	XPC	XRCC1	XRCC 2	XRCC3	XRCC4	XRCC 5	XRCC 6	XRCC6BO 1
H	ACTB	B2M	GAPD H	HPRT1	RPLP 0	HGDC	RTC	RTC	RTC	PPC	PPC	PPC

Tab. 11 Seznam zkratek genů

Zkratka	Plný název genu (anglicky)
ABL1	C-abl oncogene 1, non-receptor tyrosine kinase
ACTB	Actin, beta
AGP	Alpha-1-acid glycoprotein
APEX1	APEX nuclease (multifunctional DNA repair enzyme) 1
APEX2	APEX nuclease (apurinic/apyrimidinic endonuclease) 2
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
ATRIP	ATR interacting protein
ATXN3	Ataxin 3
B2M	Beta-2-microglobulin
BARD1	BRCA1 associated RING domain 1
BAX	BCL2-associated X protein
BBC3	BCL2 binding component 3
BLM	Bloom syndrome, RecQ helicase-like
BRCA1	Breast cancer 1, early onset
BRCA2	Breast cancer 2, early onset
BRIP1	BRCA1 interacting protein C-terminal helicase 1
CCNH	Cyclin H
CCNO	Cyclin O
Cd38+	cluster of differentiation 38
CDC25A	Cell division cycle 25 homolog A (S. pombe)
CDC25C	Cell division cycle 25 homolog C (S. pombe)
CDK7	Cyclin-dependent kinase 7
CIB1	Calcium and integrin binding 1 (calmyrin)
CRY1	Cryptochrome 1 (photolyase-like)
CSNK2A2	Casein kinase 2, alpha prime polypeptide
DDB1	Damage-specific DNA binding protein 1, 127kDa
DDIT3	DNA-damage-inducible transcript 3
DMC1	DMC1 dosage suppressor of mck1 homolog, meiosis-specific homologous recombination (yeast)
ERCC1	Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 1 (includes overlapping antisense sequence)
ERCC2	Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 2
ERCC3	Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation g (xeroderma pigmentosum group B complementing)
ERCC4	Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 4
ERCC5	Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 5
ERCC6	Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 6
ERCC8	Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 8
Erk	extracellular signal-regulated kinases
EXO1	Exonuclease 1
FANCD2	Fanconi anemia, complementation group D2
FANCE	Fanconi anemia, complementation group A
FANCG	Fanconi anemia, complementation group G
FEN1	Flap structure-specific endonuclease
GADD45A	Growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha
GADD45G	Growth arrest and DNA-damage-inducible, gamma
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
H2AFX	H2A Histone Family Member X
HTRP1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1

HGDC	Human Genomic DNA Contamination
HUS1	HUS1 checkpoint homolog (S. pombe)
CHEK1	Checkpoint kinase 1 homolog (S. pombe)
CHEK2	Checkpoint kinase 2 homolog (S. pombe)
LIG1	Ligase I, DNA, ATP-dependent
LIG3	Ligase III, DNA, ATP-dependent
LIG4	Ligase IV, DNA, ATP-dependent
MAPK12	Mitogen-activated protein kinase 12
MBD4	Methyl-CpG binding domain protein 4
MCPH1	Microcephalin 1
MDC1	Mediator of DNA-damage checkpoint 1
MGMT	O-6-methylguanine-DNA methyltransferase
MLH1	MutL homolog 1, colon cancer, nonpolyposis type 2 (E. coli)
MLH3	MutL homolog 3 (E. coli)
MMS19	MMS19 nucleotide excision repair homolog (S. cerevisiae)
MPG	N-methylpurine-DNA glycosylase
MPS2	PMS2 postmeiotic segregation increased 2 (S. cerevisiae)
MRE11A	MRE11 meiotic recombination 11 homolog A (S. cerevisiae)
MSH2	MutS homolog 2, colon cancer, nonpolyposis type 1 (E. coli)
MSH3	MutS homolog 3 (E. coli)
MSH4	MutS homolog 4 (E. coli)
MSH5	MutS homolog 5 (E. coli)
MSH6	MutS homolog 6 (E. coli)
MUTYH	MutY homolog (E. coli)
NBN	Nibrin
NEIL1	Nei endonuclease VIII-like 1 (E. coli)
NEIL2	Nei endonuclease VIII-like 2 (E. coli)
NEIL3	Nei endonuclease VIII-like 3 (E. coli)
NTHL1	Nth endonuclease III-like 1 (E. coli)
OGG1	8-oxoguanine DNA glycosylase
PARP1	Poly (ADP-ribose) polymerase 1
PARP2	Poly (ADP-ribose) polymerase 2
PARP3	Poly (ADP-ribose) polymerase family, member 3
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PDGF	Platelet-derived growth factor
PDGFR	Platelet-derived growth factor receptor
PMS1	PMS1 homolog 1, mismatch repair system component
PNKP	Polynucleotide kinase 3'-phosphatase
POLB	Polymerase (DNA directed), beta
POLD3	Polymerase (DNA-directed), delta 3, accessory subunit
POLL	Polymerase (DNA directed), lambda
PPC	Positive PCR Control
PPM1D	Protein phosphatase, Mg ²⁺ /Mn ²⁺ dependent, 1D
PPP1R15A	Protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 15A
PRKDC	Protein kinase, DNA-activated, catalytic polypeptide
RAD1	RAD1 homolog (S. pombe)
RAD17	RAD17 homolog (S. pombe)
RAD18	RAD18 homolog (S. cerevisiae)
RAD21	RAD21 homolog (S. pombe)
RAD23A	RAD23 homolog A (S. cerevisiae)
RAD23B	RAD23 homolog B (S. cerevisiae)
RAD50	RAD50 homolog (S. cerevisiae)
RAD51	RAD51 homolog (S. cerevisiae)
RAD51B	RAD51 homolog B (S. cerevisiae)
RAD51C	RAD51 homolog C (S. cerevisiae)
RAD51D	RAD51 homolog D (S. cerevisiae)
RAD52	RAD52 homolog (S. cerevisiae)

RAD54L	RAD54-like (<i>S. cerevisiae</i>)
RAD9	RAD9 homolog
RAD9A	RAD9 homolog A (<i>S. pombe</i>)
RBBP8	Retinoblastoma binding protein 8
REV1	REV1 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)
RFC	Replication factor C
RFC1	Replication factor C (activator 1) 1, 145kDa
RNF168	Ring finger protein 168
RNF8	Ring finger protein 8
RPA1	Replication protein A1, 70 kDa
RPA3	Replication protein A3, 14 kDa
RPLP0	Ribosomal protein, large, P0
RTC	Reverse Transcription Control
SH1	SRC Homology 1 domain
SH2	SRC Homology 2 domain
SH3	SRC Homology 3 domain
SIRT1	Sirtuin 1
SLK	STE20-like kinase
SMC1A	Structural maintenance of chromosomes 1A
SMUG1	Single-strand-selective monofunctional uracil-DNA glycosylase 1
SUMO1	SMT3 suppressor of mif two 3 homolog 1 (<i>S. cerevisiae</i>)
TDG	Thymine-DNA glycosylase
TOBPB1	Topoisomerase (DNA) II binding protein 1
TOP3A	Topoisomerase (DNA) III alpha
TOP3B	Topoisomerase (DNA) III beta
TP53	Tumor protein p53
TP53BP1	Tumor protein p53 binding protein 1
TP73	Tumor protein p73
TREX1	Three prime repair exonuclease 1
UNG	Uracil-DNA glycosylase
XAB2	XPA binding protein 2
XPA	Xeroderma pigmentosum, complementation group A
XPC	Xeroderma pigmentosum, complementation group C
XRCC1	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 1
XRCC2	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 2
XRCC4	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 4
XRCC5	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 5 (double-strand-break rejoining)
XRCC6	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 6
XRCC6BP1	XRCC6 binding protein 1

5 Výsledky

5.1 Stanovení citlivosti buněčných kultur na IM

Stanovení viability buněk bylo provedeno u časně a pozdní buněčné kultury KCL-22. Výsledkem testu je stanovení hodnoty IC_{50} , což je koncentrace IM, která má za následek odumření 50 % buněk. Tato analýza nám sloužila k rozhodnutí, jakou koncentraci IM použijeme pro další experimenty s izolací rezistentních klonů. Pro měření na MTT esaji jsme buňky časně a pozdní kultury KCL-22 vystavili působení IM v koncentracích 0,1 μM ; 0,2 μM ; 0,4 μM ; 0,6 μM ; 0,8 μM ; 1,0 μM a 1,2 μM . Data byla zpracována programem Excel a graf byl vytvořen na základě měření hodnot absorbance zaznamenané přístrojem Chameleon Multilabel Microplate Reader (Figura 1).

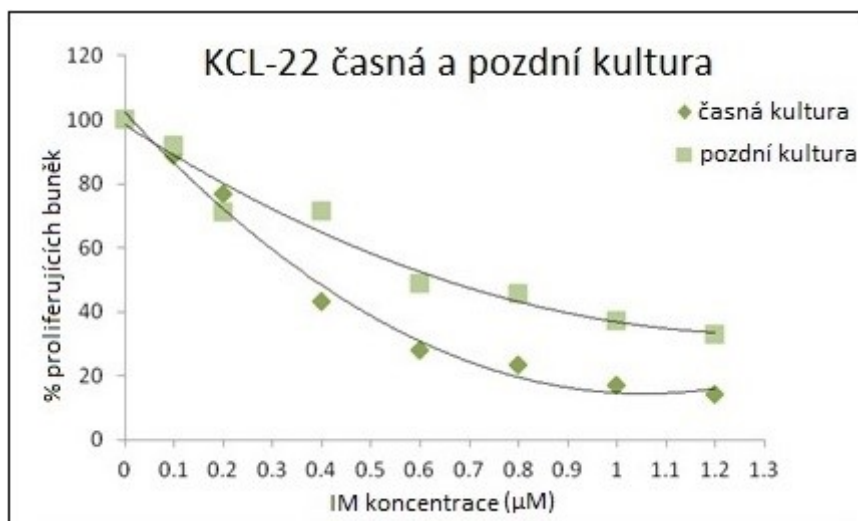


Figura 1 Stanovení viability buněk u KCL-22 časně a pozdní kultury.

Časná kultura: $y = 78.95x^2 - 166.6x + 102.3$, $R^2 = 0.989$, $IC_{50} = 0.382 \mu M$ IM

Pozdní kultura: $y = 37.47x^2 - 99.09x + 98.44$, $R^2 = 0.964$, $IC_{50} = 0.635 \mu M$ IM

Řešením kvadratických rovnic křivek získaných proložením výsledných hodnot MTT testu bylo zjištěno, že hodnota IC_{50} pro časnou kulturu je 0.382 μM IM a pro pozdní kulturu 0.635 μM IM. Časná kultura je tedy na působení IM citlivější než kultura pozdní.

5.1.1 Růst klonů v čase a různých koncentracích IM v závislosti na expresi molekuly CD38

Pro zjištění, jak sortované klony rostou v závislosti na stáří kultury, koncentraci IM a expresi povrchového markeru CD38 byly desky po sortu uchovávány v inkubátoru při 37 °C a 5 % CO₂ a každý týden bylo analyzováno, zda v jamkách rostou/nerostou jednotlivé klony a byl zaznamenán počet rostoucích klonů (Výsledkové tabulky 1-4; Figura 2).

Výsledková tab. 1 Počet získaných klonů z CD38+ buněk časně kultury KCL-22

Koncentrace IM	Počet klonů 1. týden	Počet klonů 2. týden	Počet klonů 3. týden	Počet klonů 4. týden
Bez IM	4	10	12	15
0.0004 µl	0	5	8	8
0.004 µl	0	4	6	6
0.04 µl	1	5	7	12
0.4 µl	0	0	0	0

Výsledková tab. 2 Počet získaných klonů z CD38- buněk časně kultury KCL-22

Koncentrace IM	Počet klonů 1. týden	Počet klonů 2. týden	Počet klonů 3. týden	Počet klonů 4. týden
Bez IM	2	24	25	27
0.0004 µl	2	23	24	25
0.004 µl	0	21	24	25
0.04 µl	0	16	21	24
0.4 µl	0	0	0	0

Výsledková tab. 3 Počet získaných klonů z CD38+ buněk pozdní kultury KCL-22

Koncentrace IM	Počet klonů 1. týden	Počet klonů 2. týden	Počet klonů 3. týden	Počet klonů 4. týden
Bez IM	0	1	2	3
0.0004 µl	0	6	8	12
0.004 µl	0	11	15	18
0.04 µl	-	-	-	-
0.4 µl	0	0	0	0

Výsledková tab. 4 Počet získaných klonů z CD38- buněk pozdní kultury KCL-22

Koncentrace IM	Počet klonů 1. týden	Počet klonů 2. týden	Počet klonů 3. týden	Počet klonů 4. týden
Bez IM	0	2	7	9
0.0004 µl	1	9	17	20
0.004 µl	0	9	20	26
0.04 µl	-	-	-	-
0.4 µl	0	0	0	0

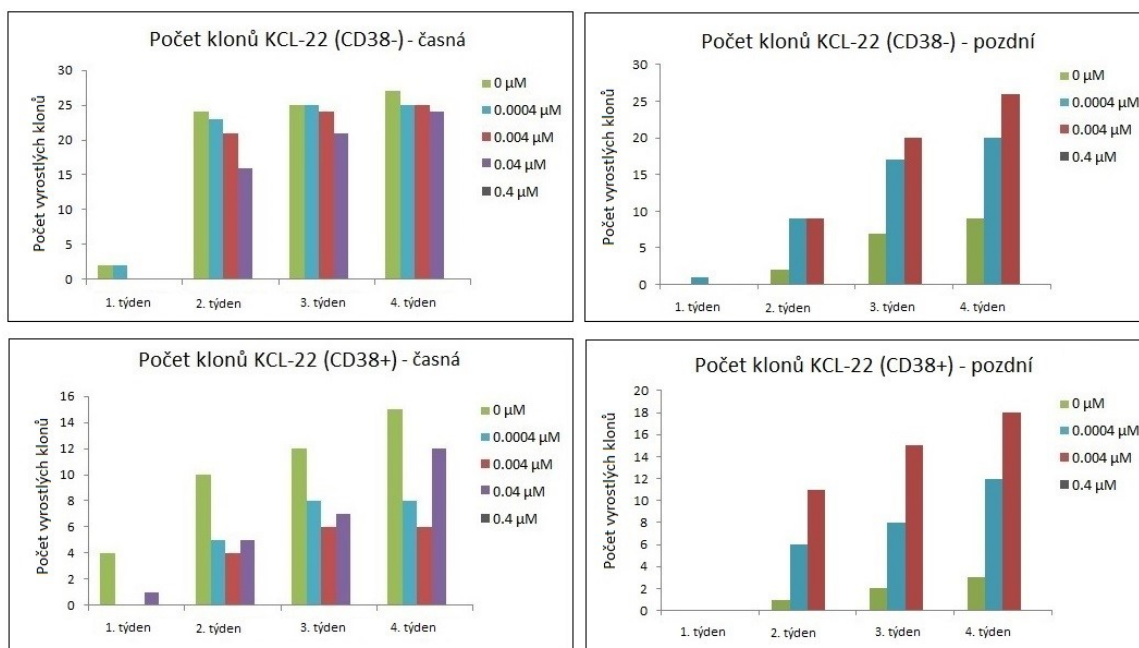


Figura 2 Počet klonů KCL-22 izolovaných z časné a pozdní kultury buněk KCL-22 v závislosti na expresi povrchové molekuly CD38 (grafické znázornění data z Výsledkových tabulek 1-4)

Na základě těchto výsledků jsme zjistili odlišnosti v míře klonogenicity buněk z časné a pozdní kultury KCL-22. Nejvíce klonů z časné kultury vyrostlo v médiu bez IM, přičemž se celkově projevoval trend nepřímé úměrnosti mezi koncentrací IM v médiu a počtem získaných klonů v jednotlivých časových bodech analýzy. CD38- buňky z časné kultury dávaly za všech srovnatelných růstových podmínek, tj. v různých hladinách IM i v prostředí bez IM vyrůst většímu množství klonů než buňky CD38+ z téže kultury. Tento rozdíl byl signifikantní pro růst v koncentraci 0.004 μM IM ($p=0,0338$), se kterou se dále pracovalo, i při společném srovnání všech růstových podmínek CD38+ a CD38- klonů časné kultury ($p = 0,0007$).

I u buněk pozdní kultury vyrostlo ve stejných kultivačních podmínkách (hladinách IM) poněkud více klonů z CD38- buněk ve srovnání s CD38+ buňkami, nicméně tento rozdíl nebyl signifikantní ($p = 0,3539$).

Souhrnně vyrostlo méně klonů z CD38+ buněk ve srovnání s počtem klonů z CD38- buněk. Následně jsme pracovali s klony rostoucími v 0,004 μM IM, které byly po 1 měsíci přesazeny do média s 0,4 μM IM a po dalším měsíci kultivace byly žijící klony přesazeny do média s 4 μM IM. Celkově jsme při sortu do 0,004 μM IM vyizolovali 31 klonů (25 CD38- a 6 CD38+) z časné kultury a 44 klonů (26 CD38+

a 18 CD38-) z pozdní kultury KCL-22. Přesazení do 0,4 μ M IM přežilo celkově 20 klonů z časně kultury a 24 klonů z kultury pozdní *. Přesazení klonů do 4 μ M IM výsledně přežily 4 CD38- klony z časně kultury KCL-22 (B8-T315I, B10-Y253H, E4-WT a F4-E255K) a 2 CD38- (E5, G4) klony z pozdní kultury.

* Část klonů z pozdní kultury nepřežila v prostředí 0,4 μ M IM v důsledku přítomnosti kontaminace. Z uvedených počtů proto nelze usuzovat na zvýšenou mortalitu klonů pozdní kultury rostoucích v 0,4 μ M IM oproti klonům získaným z časně kultury KCL-22.

5.1.2 Stanovení míry proliferace klonů KCL-22

Měření proliferace bylo provedeno 14 dní po přesazení buněčných klonů do koncentrace 0,4 μ M IM. Cílem experimentu bylo srovnání míry proliferace klonů v závislosti na stáří kultury a expresi molekuly CD38. Pro měření průměrné proliferace byly použity 3 náhodně vybrané CD38+ a 3 CD38- klony od každé kultury, jejichž míra proliferace byla následně zprůměrována a srovnána s proliferací buněk z obou (časně i pozdní) parentálních kultur rostoucích v prostředí bez IM. Zjistili jsme, že buňky časně kultury KCL-22 proliferují v prostředí bez IM rychleji než buňky z kultury pozdní. U jednotlivých klonů v průměru nejrychleji proliferovaly CD38- klony z časně kultury KCL-22 a nejpomaleji naopak CD38+ klony z časně kultury KCL-22. U klonů CD38+ a CD38- klonů z pozdní kultury KCL-22 nepozorujeme větší rozdíly v míře proliferace (jejich graficky znázorněná míra proliferace má téměř identický průběh a nachází se mezi průměrnými hodnotami pro klony z časně kultury). Data z měření hodnot absorbance zaznamenaná přístrojem Chameleon Multilabel Microplate Reader byla zpracována v Excelu do podoby grafu (Figura 3). Výsledky dokládají, že CD38+ buňky vykazují oproti CD38- buňkám z časně kultury KCL-22 nízkou míru proliferace v přítomnosti IM, nicméně tento rozdíl není relevantní pro buňky z pozdní kultury KCL-22.

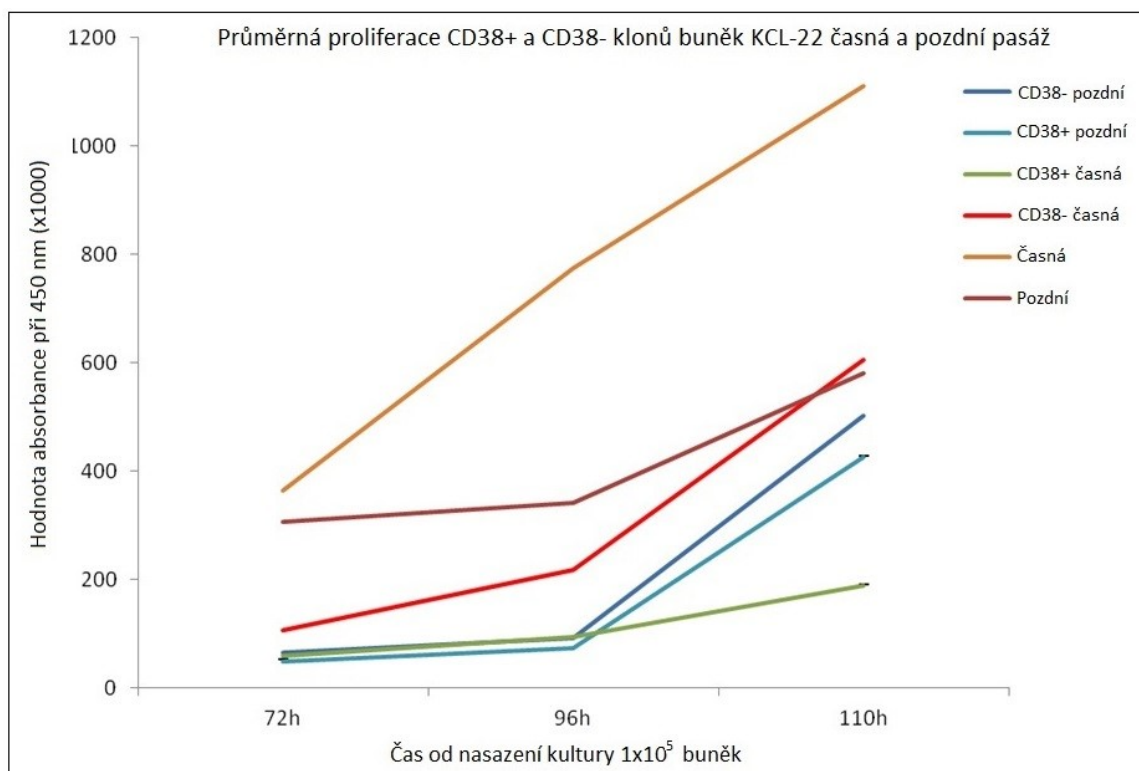


Figura 3 Průměrná míra proliferace CD38+ a CD38- klonů z časně, resp. pozdní kultury buněk KCL-22

5.1.3 Stanovení míry apoptózy klonů KCL-22

V dalším experimentu jsme se zaměřili na stanovení viability a apoptózy klonů KCL-22 rostoucích v prostředí s IM v závislosti na expresi molekuly CD38 a na stáří buněčné kultury. Apoptóza buněk byla měřena pomocí Annexinu V-APC a propidiumjodidu. Měření bylo provedeno 14 dní po přesazení buněčných klonů do koncentrace 0,4 μ M IM v návaznosti na měření míry proliferace. U všech klonů ($n = 44$) byl stanoven procentuální podíl populací vitálních (Annexin V-/propidiumjodid-), časně apoptotických (Annexin V+/propidiumjodid-) a pozdně apoptotických (propidiumjodid+) buněk. Hodnoty vyjadřující relativní velikost zmíněných populací (v %) pro CD38+ resp. CD38- klony izolované z časně resp. pozdní kultury buněk KCL-22 byly následně zprůměrovány a zpracovány v Excelu do podoby grafů (Figura 4).

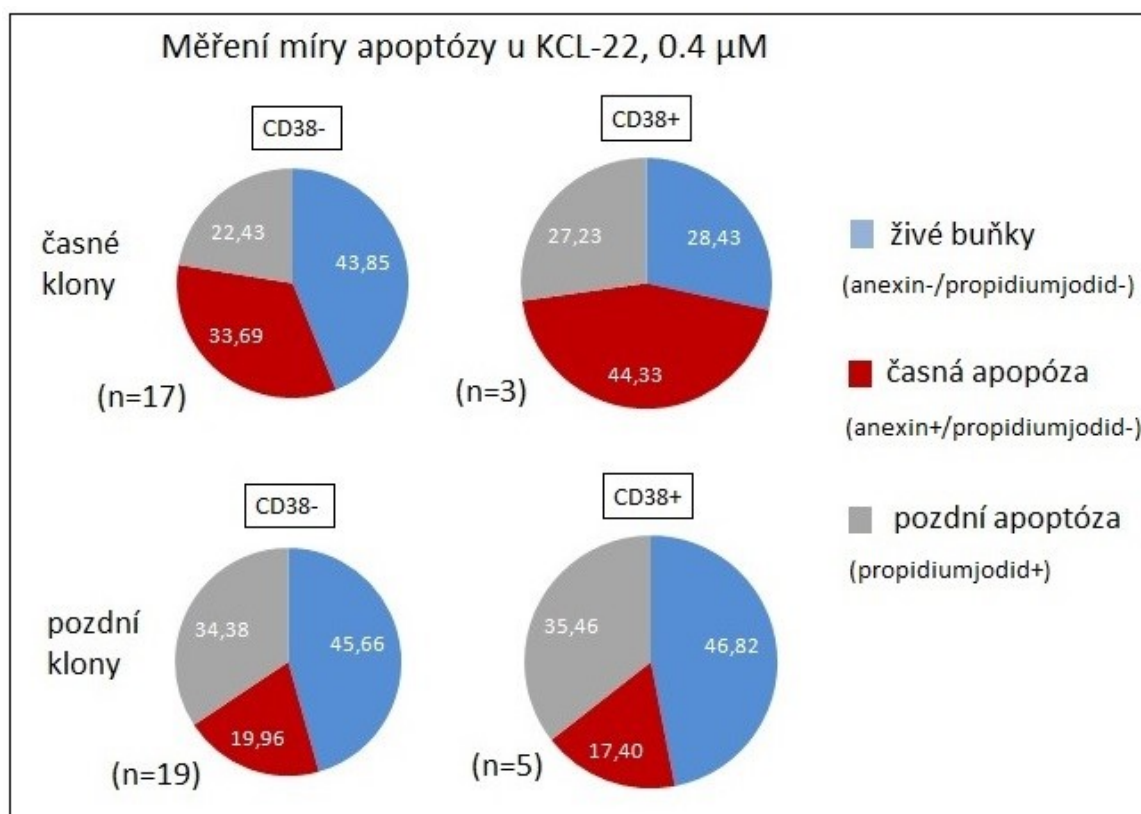


Figura 4 Relativní průměrná velikost vitálních (modře), časně apoptotických (červeně) a pozdně apoptotických (šedě) populací v klonech KCL-22 rostoucích v koncentraci 0,4 μ M IM.

Pro měření bylo použito 17 CD38- klonů a 3 klony CD38+ z časně kultury a 19 CD38- klonů a 5 CD38+ klonů z pozdní kultury buněk KCL-22. Výsledky ukazují na rozdíl v míře apoptózy a tedy i senzitivity na imatinib u CD38+ a CD38- klonů z časně kultury, kde CD38+ klony v průměru vykazovaly významně sníženou relativní velikost populace vitálních buněk. U CD38+ z časně kultury KCL-22 bylo nalezeno pouze 28,43 % viabilních buněk a 71,56 % procházejících apoptózou, zatímco u CD38- klonů z časně kultury KCL-22 (a u CD38+ i CD38- klonů z pozdní kultury) bylo detekováno zhruba 45% zastoupení viabilních buněk a 55,12 % buněk procházejících apoptózou. Rozdíly v míře apoptózy u CD38+ a CD38- buněk z časně kultury nebyly statisticky signifikantní ($p = 0,1796$) z důvodu malého počtu klonů dostupných pro analýzu a také kvůli širšímu rozptylu hodnot pro jednotlivé populace mezi klony, nicméně zejména v kontextu předchozích výsledků z klonogenicity a měření míry proliferace naznačují narušené přežívání CD38+ klonů z časných kultur při působení vyšších koncentrací imatinibu.

5.1.4 Hladina exprese BCR-ABL1

Ve vybraných časových bodech byla z izolované buněčné RNA prospektivně i retrospektivně stanovena exprese BCR-ABL1. Předpokládali jsme, že počáteční vyšší hladina exprese BCR-ABL1 by mohla předurčovat buněčný klon k vytvoření mutace. Proto jsme ve 21. dni kultivace stanovili expresi BCR-ABL1 u CD38- klonů B8-T315I, B10-Y253H, E4-WT a F4-E255K, které při následné kultivaci vyvinuly rezistenci a (kromě klonu E4) mutace v BCR-ABL1, a srovnali ji s expresí BCR-ABL1 u čtyřech dalších CD38- klonů z časné kultury KCL-22, které rezistenci na 4 μ M IM ani mutace v BCR-ABL1 nevyvinuly. Výsledky ukázaly (Figura 5), že klony, které následně vyvinuly rezistenci, neměly na počátku kultivace vyšší expresi BCR-ABL1 než klony, které ji nevyvinuly a náš předpoklad se tudíž nepotvrdil. Dále jsme změřili expresi BCR-ABL1 u klonů, které vyvinuly rezistenci, v čase. Pozorovali jsme, že s délkou kultivace a hladinou IM, které byly klony vystaveny, docházelo k postupnému nárůstu exprese BCR-ABL1 (Figura 6).

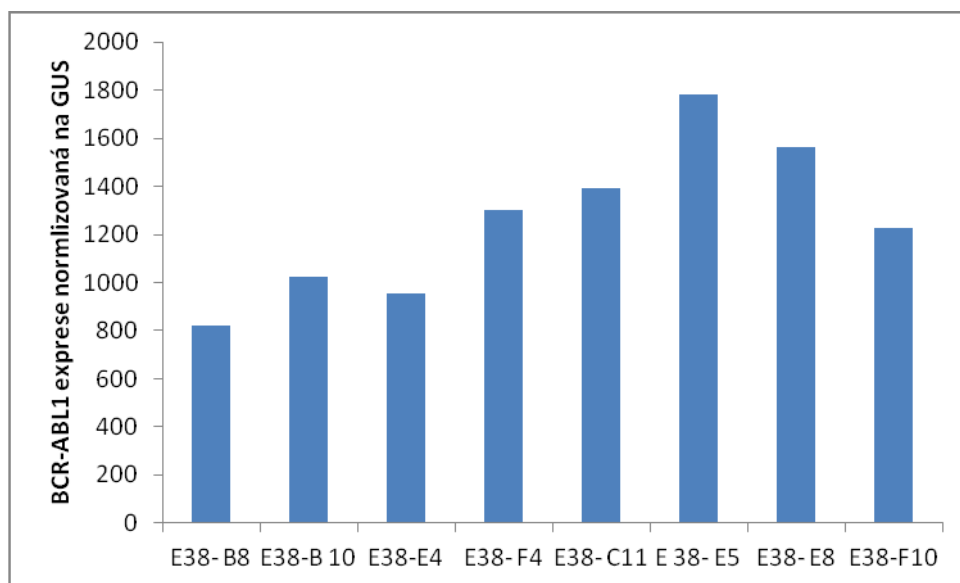


Figura 5 Srovnání exprese BCR-ABL1 (normalizovaná na GUS) ve dni 21 kultivace v CD38- klonech, které následně vyvinuly (B8-T315I, B10-Y253H, E4-WT a F4-E255K) nebo nevyvinuly (C11, E5, E8 a F10) rezistenci na 4 μ M IM.

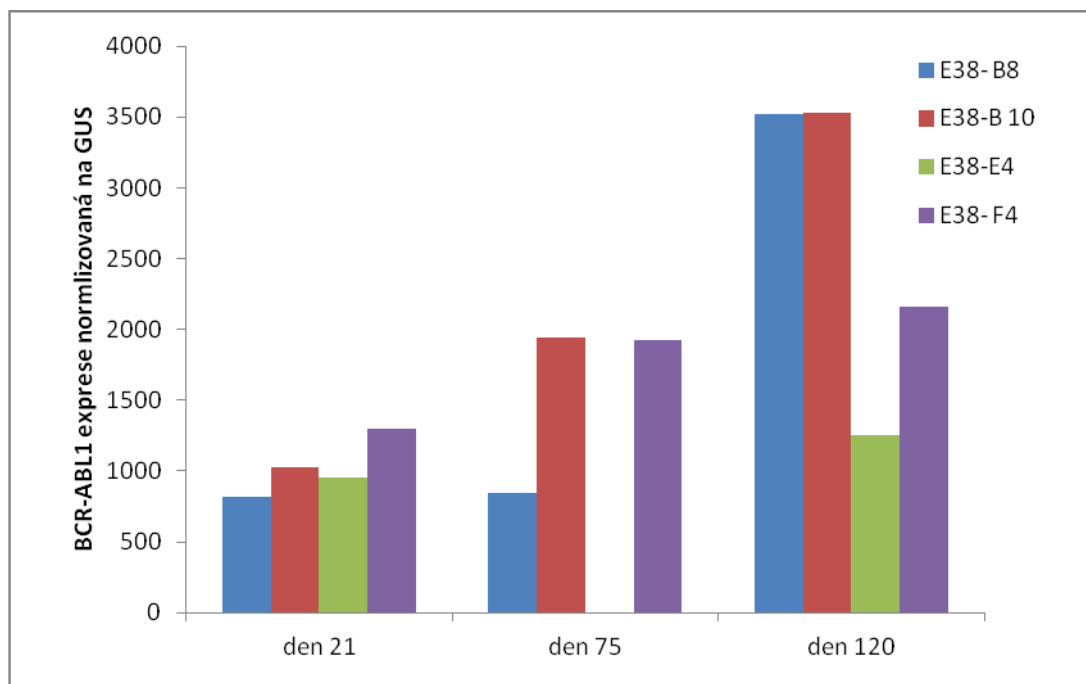


Figura 6. Srovnání exprese BCR-ABL1 (normalizovaná na GUS) ve dnech 21 (0,004 μ M IM), 75 (4 μ M IM) a 120 (4 μ M IM) kultivace v CD38- kloněch B8-T315I, B10-Y253H, E4-WT a F4-E255K, které vyvinuly rezistenci na 4 μ M IM. Exprese BCR-ABL1 v klonu E4-WT ve dni 75 nemohla být stanovena kvůli nedostatku vhodného materiálu (RNA).

5.1.5 Expresní arrays

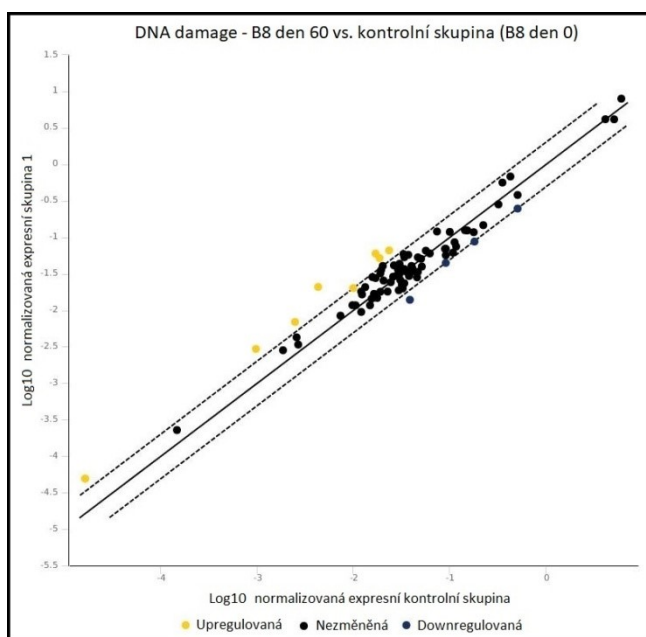
Pro změření míry exprese vybraných genů účastníci se signalizace poškození a reparace DNA byly použit RT² Profiler PCR arrays panely (Qiagen). Do analýz byly vloženy [1] vzorky RNA pocházející z CD38- klonů B8-T315I, B10-Y253H, E4-WT a F4-E255K z doby první izolace RNA po sortu klonů (den 0, tzv. kontrolní skupina), [2] vzorky RNA izolované ze stejných klonů B8-T315I, B10-Y253H, E4-WT a F4-E255K v době počáteční detekce mutací v KD BCR-ABL1 v 0,4 μ M IM (den 60 pro klony B8-T315I a F4-E255K a den 75 pro klon B10-Y253H; den 60 byl zvolen i pro klon E4-WT, který mutace nevyvinul) a [3] vzorky RNA izolované ze stejných klonů B8-T315I, B10-Y253H, E4-WT a F4-E255K v době detekce vysokých hladin mutovaných transkriptů v KD BCR-ABL1 v 0,4 μ M IM (den 75 pro klon B8, den 105 pro klon F4-E255K a den 90 pro klon B10-Y253H; den 75 byl zvolen i pro klon E4-WT, který mutace nevyvinul). V analýzách se srovnávala exprese genů v panelech mezi kontrolní skupinou (den 0) a vzorky buď v době detekce mutací v nízké (den 60), nebo již vysoké (den > 75) hladině. Analýzy byly prováděny u každého klonu

pro panel RT² Prolifer PCR Array Human DNA Damage Signaling Pathway a pro panel RT² Prolifer PCR Array Human DNA Repair (Kapitola 4.11), a to vždy v duplikátech (každý panel byl nezávisle analyzován 2×). Získaná data byla programem automaticky vynesena do grafů (viz náhledy) s vyznačením genů se signifikantně zvýšenou (žluté tečky nad čarou cutoffu) a signifikantně sníženou (modré tečky pod čarou cutoffu) expresí. Pro nízkou názornost tohoto automaticky generovaného zobrazení jsme geny se signifikantně zvýšenou a sníženou expresí vynesli do výsledkových tabulek.

Výsledkové tabulky (a k nim připojené náhledy) jsou vždy čtyři pro každý jednotlivý analyzovaný klon: [1] vs. Den [2] pro DNA Damage Signaling; [1] vs. Den [3] pro DNA Damage Signaling; [1] vs. Den [2] pro DNA Repair a [1] vs. Den [3] pro DNA Repair. Veškeré analyzované Arrays splňovaly kritéria pro RT a PCR kontroly reprodukovatelnosti a negativní výsledek testu kontaminace genomovou DNA.

5.1.5.1 KCL-22 CD38- Klon B8 (T315I)

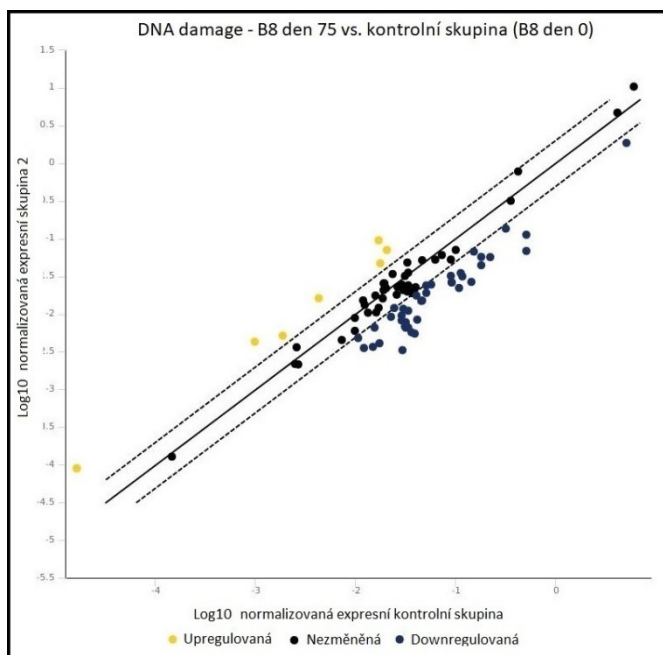
U klonu B8 došlo k získání mutace BCR-ABL1 T315I.



Výsledková tabulka 5

DNA DAMAGE – Overexprimované (červeně) a underexprimované (modře) geny u klonu B8 ve dnu 60 vs. kontrolní skupina

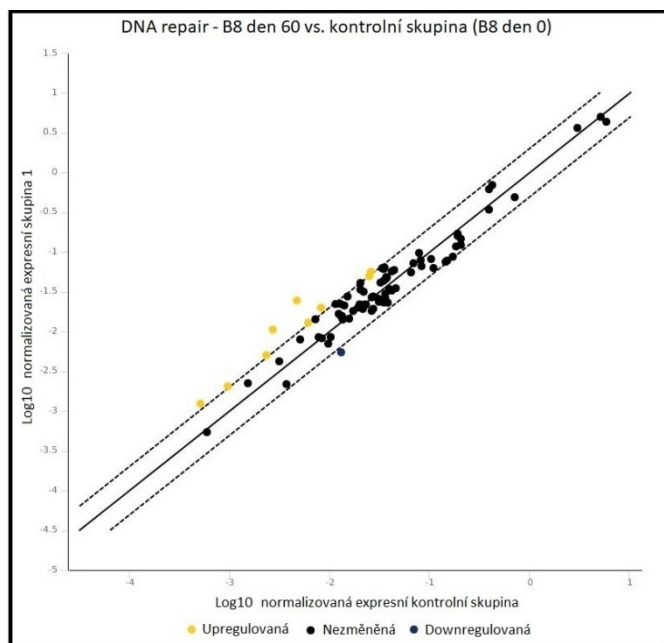
Gen	Změna exprese v násobcích	Gen	Změna exprese v násobcích	Gen	Změna exprese v násobcích
ATM	4,87	PPP1R15A	3,53	PCNA	-2,07
ATRX	2,8	RAD51B	2,03	XRCC6	-2,09
BBC3	3,01	RNF168	2,77		
MLH1	2,76	CDC25A	-2,81		



Výsledková tabulka 6

DNA DAMAGE – Overexprimované (červeně) a underexprimované (modře) geny u klonu B8 ve dnu 75 vs. kontrolní skupina

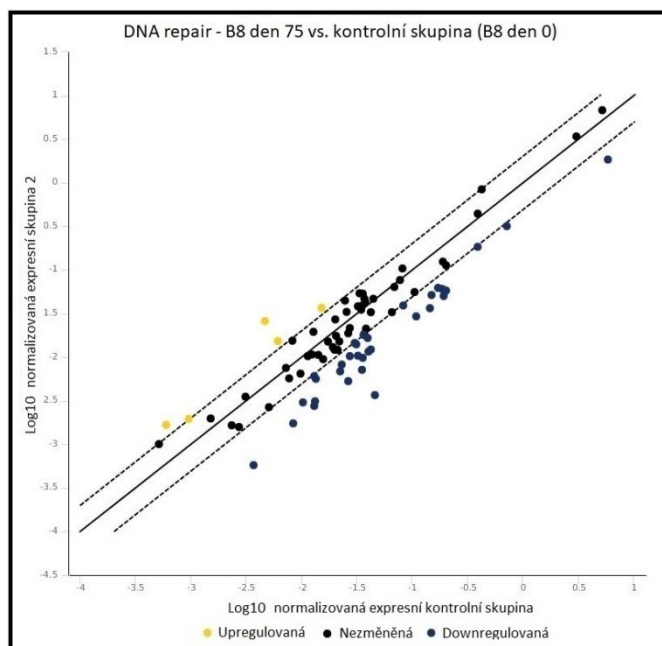
Gen	Změna exprese v násobcích	Gen	Změna exprese v násobcích	Gen	Změna exprese v násobcích
ATM	3,79	DDB1	-3,15	RAD1	-3,08
BBC3	4,38	EXO1	-5,15	RAD51	-4,82
CDKN1A	3,39	FANCA	-4,56	RAD9A	-4,09
DDIT3	2,67	FANCD2	-2,59	RBBP8	-3,1
GADD45A	2,75	FANCG	-4,24	RNF8	-2,03
PPP1R15A	5,58	FEN1	-5,48	RPA1	-3,49
APEX1	-2,36	H2AFX	-4,54	SMC1A	-3,7
ATRIP	-3,44	LIG1	-8,87	SUMO1	-2,68
BARD1	-2,34	MDC1	-2,32	TOPBP1	-2,14
BAX	-3,25	MSH2	-2,84	UNG	-4,9
BLM	-6,31	MSH3	-2,34	XRCC2	-3,04
BRCA1	-4,14	NTHL1	-2,45	XRCC6	-4,12
BRIP1	-3,05	PARP1	-3,96		
CDC25A	-7,1	PCNA	-7,43		
CHEK1	-4,99	PPM1D	-2,21		
CHEK2	-3,53	PRKDC	-2,29		



Výsledková tabulka 7

DNA REPAIR – Overexprimované (červeně) a underexprimované (modře) geny u klonu B8 ve dnu 60 vs. kontrolní skupina

Gen	Změna exprese v násobcích	Gen	Změna exprese v násobcích	Gen	Změna exprese v násobcích
ATM	5,22	MLH1	3,88	SMUG1	2,16
ATXN3	2,41	MRE11A	2,2	RAD23A	-2,39
CDK7	2,01	NEIL1	2,14		
ERCC6	2,11	POLL	2,41		



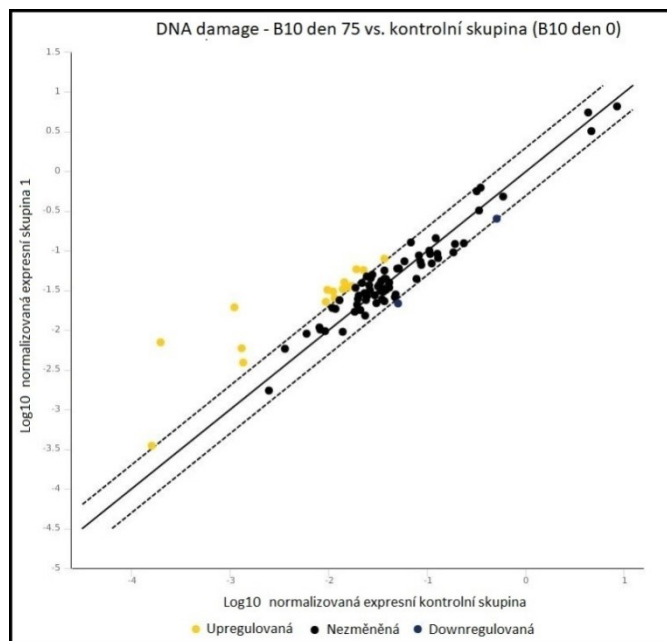
Výsledková tabulka 8

DNA REPAIR – Overexprimované (červeně) a underexprimované (modře) geny u klonu B8 ve dnu 75 vs. kontrolní skupina

Gen	Změna exprese v násobcích	Gen	Změna exprese v násobcích	Gen	Změna exprese v násobcích
ATM	5,5	ATM	5,5	RPA1	-3,73
ERCC6	2,49	ERCC6	2,49	RPA3	-3,51
LIG4	2,43	LIG4	2,43	TDG	-2,12
MSH4	2,78	MSH4	2,78	TOP3A	-3,42
NEIL1	2,04	NEIL1	2,04	TOP3B	-3,24
APEX1	-2,14	APEX1	-2,14	TREX1	-2,67
APEX2	-6,48	PARP2	-2,1	UNG	-4
BRCA1	-3,11	POLD3	-4,76	XRCC2	-2,39
BRCA2	-4,24	RAD18	-12,55	XRCC5	-2,24
BRIP1	-3,68	RAD23A	-2,17	XRCC6	-2,73
DDB1	-3,06	RAD51	-4,92		
ERCC2	-2,03	RAD51C	-4,84		
EXO1	-3,46	RAD54L	-2,81		

5.1.5.2 KCL-22 CD38- Klon B10 (Y253H)

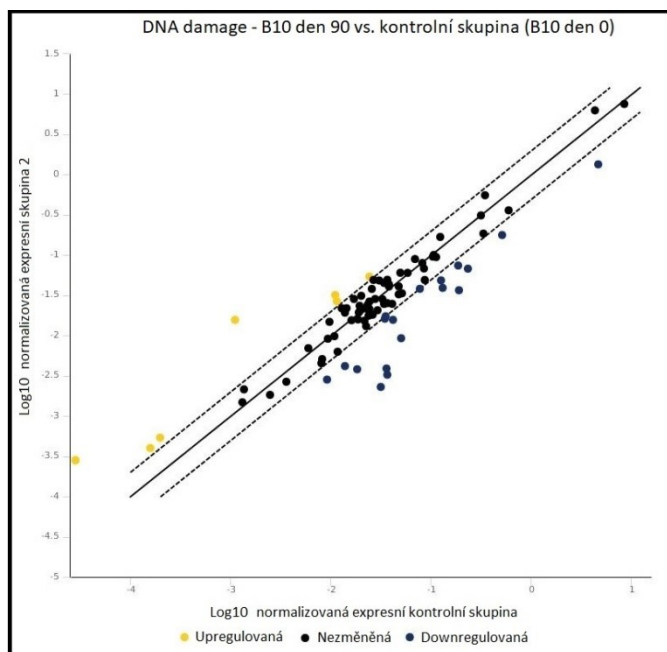
U klonu B10 došlo k získání mutace BCR-ABL1 Y253H.



Výsledková tabulka 9

DNA DAMAGE – Overexprimované (červeně) a underexprimované (modře) geny u klonu B10 ve dnu 75 vs. kontrolní skupina

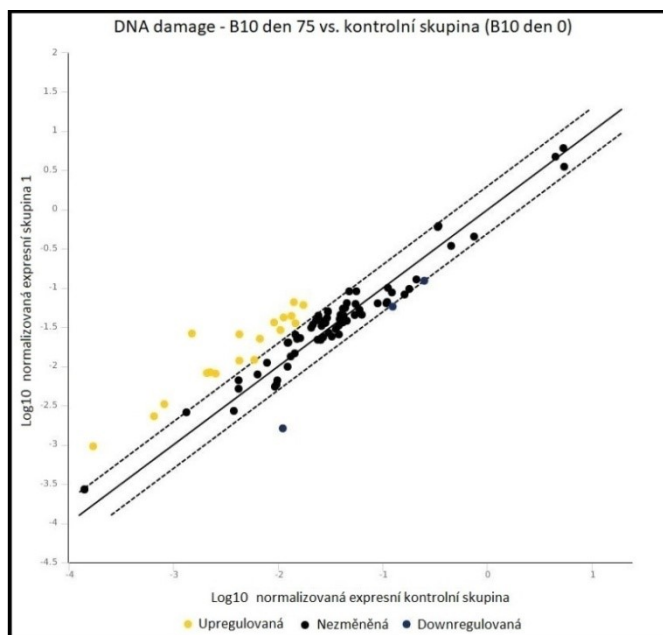
Gen	Změna exprese v násobcích	Gen	Změna exprese v násobcích	Gen	Změna exprese v násobcích
ATM	17,43	ERCC1	2,16	REV1	2,16
ATRX	3,06	MLH3	2,42	XPA	2,84
BBC3	4,47	MRE11A	2,79	CDC25A	-2,32
CDK7	2,11	PPP1R15A	2,51	PCNA	-2,01
DDB2	2,19	RAD50	2,35		
DDIT3	2,78	RAD51B	3,31		



Výsledková tabulka 10

DNA DAMAGE – Overexprimované (červeně) a underexprimované (modře) geny u klonu B10 ve dnu 90 vs. kontrolní skupina

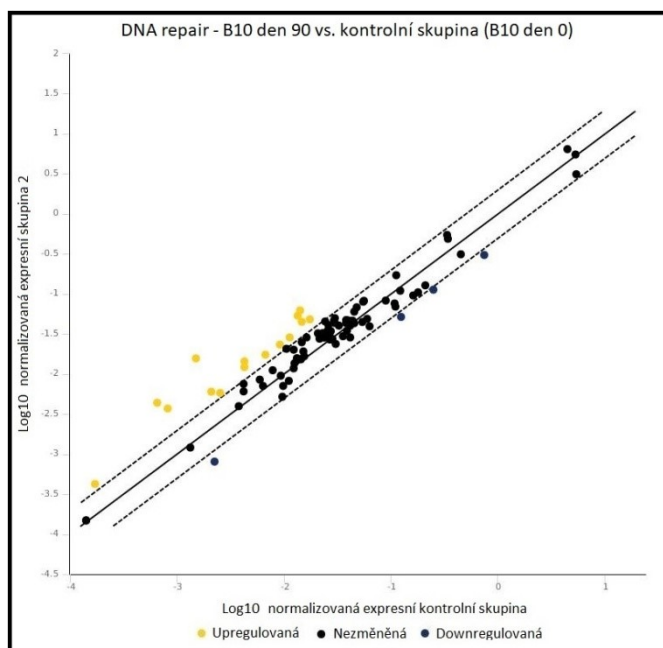
Gen	Změna exprese v násobcích	Gen	Změna exprese v násobcích	Gen	Změna exprese v násobcích
ATM	14,07	CDC25A	-5,43	RAD18	-9,22
DDB2	2,34	DDB1	-5,21	RAD9A	-4,84
DDIT3	2,9	ERCC2	-2,05	SMC1A	-2,59
MPG	2,21	LIG1	-2,14	SUM01	-2,65
ATRIP	-3,32	PARP1	-3,47	XRCC6	-2,51
BAX	-3,32	PCNA	-2,87		
BLM	-13,78	PPM1D	-3,25		



Výsledková tabulka 11

DNA REPAIR – Overexprimované (červeně) a underexprimované (modře) geny u klonu B10 ve dnu 75 vs. kontrolní skupina

Gen	Změna exprese v násobcích	Gen	Změna exprese v násobcích	Gen	Změna exprese v násobcích
ATM	17,54	MLH3	2,77	RAD51B	3,71
ATXN3	6,03	MRE11A	3,3	RAD52	3,38
BRCA2	2,04	MSH4	5,59	SMUG1	3,94
ERCC5	3,49	MSH5	4,65	XPA	4,05
ERCC6	2,79	PARP3	3,19	PARP1	-2,01
LIG4	3,94	POLL	3,55		
MLH1	3,79	RAD50	2,43		



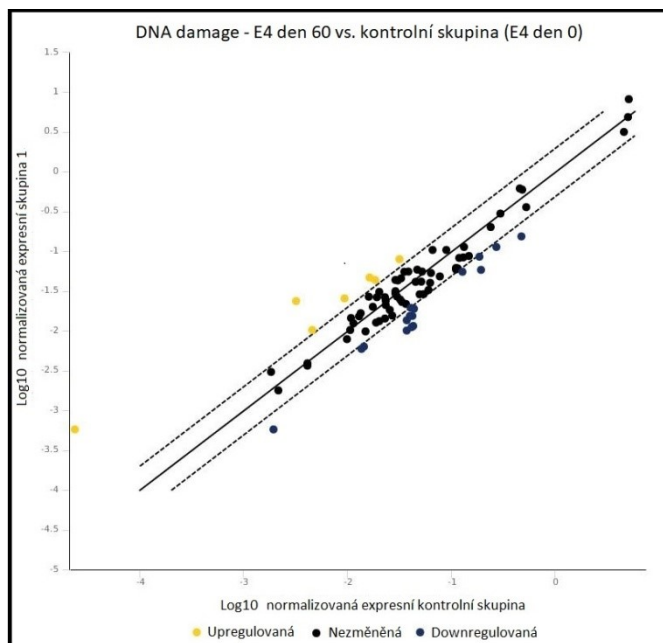
Výsledková tabulka 12

DNA REPAIR – Overexprimované (červeně) a underexprimované (modře) geny u klonu B10 ve dnu 90 vs. kontrolní skupina

Gen	Změna exprese v násobcích	Gen	Změna exprese v násobcích	Gen	Změna exprese v násobcích
ATM	10,49	MSH4	2,47	XPA	4,55
ATXN3	3,39	MSH5	4,4	MLH1	-2,75
DDB2	3,07	PARP3	2,3	PARP1	-2,2
ERCC5	2,77	POLL	6,73	XRCC5	-2,44
ERCC6	2,89	RAD51B	2,53		
LIG4	2,52	RAD52	2,6		
MRE11A	4	SMUG1	2,89		

5.1.5.3 KCL-22 CD38- Klon E4 (WT)

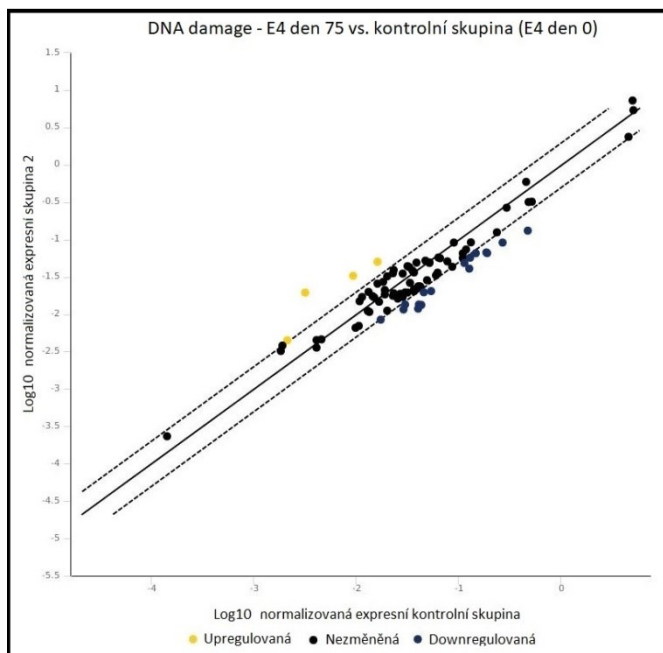
U klonu E4 nebyla nalezena žádná mutace v KD BCR-ABL1.



Výsledková tabulka 13

DNA DAMAGE – Overexprimované (červeně) a underexprimované (modře) geny u klonu E4 ve dnu 60 vs. kontrolní skupina

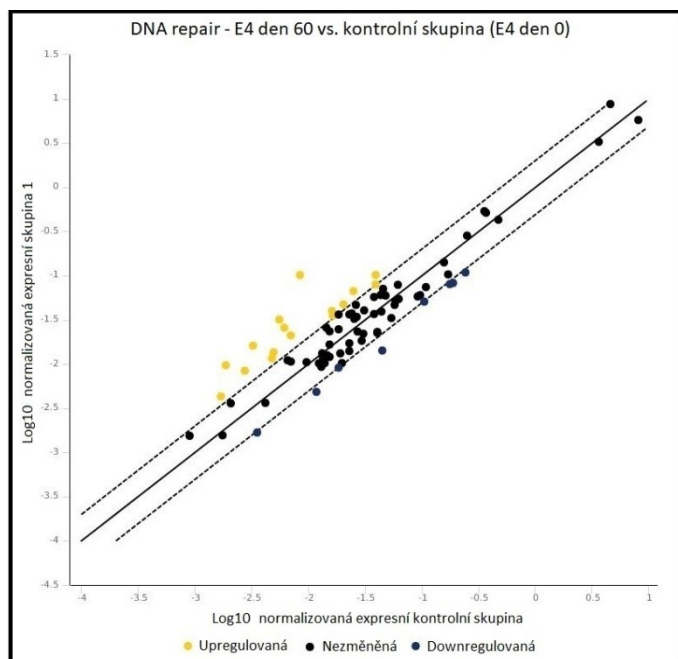
Gen	Změna exprese v násobcích	Gen	Změna exprese v násobcích	Gen	Změna exprese v násobcích
ATM	7,38	CDC25A	-2,6	PCNA	-3,07
ATRX	2,51	CHEK1	-3,7	RAD17	-2,27
HUS1	2,22	CHEK2	-2,08	RAD51	-2,3
PPP1R15A	2,87	EXO1	-3,71	TP53	-2,28
RAD51B	2,74	FEN1	-2,17	UNG	-2,32
REV1	2,36	LIG1	-2,72	XRCC6	-3,29
BLM	-3,71	MLH1	-3,34		
BRCA1	-2,71	PARP1	-2,39		



Výsledková tabulka 14

DNA DAMAGE – Overexprimované (červeně) a underexprimované (modře) geny u klonu E4 ve dnu 75 vs. kontrolní skupina

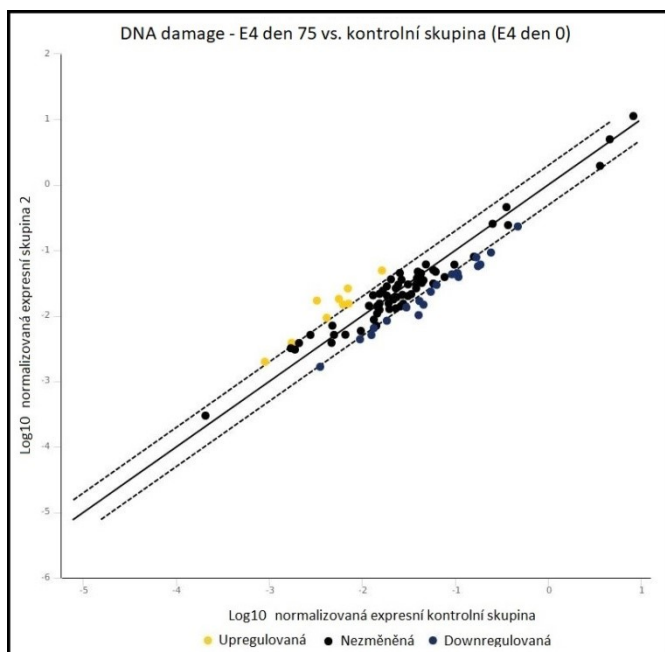
Gen	Změna exprese v násobcích	Gen	Změna exprese v násobcích	Gen	Změna exprese v násobcích
ATM	6,06	BAX	-2,24	PARP1	-2,98
BBC3	2,09	CDC25A	-3,39	PCNA	-3,59
PPP1R15A	3,08	EXO1	-3,06	RAD1	-2,31
RAD51B	3,49	FANCG	-2,5	RAD51	-3,27
ATRIP	-2,06	FEN1	-2,76		



Výsledková tabulka 15

DNA REPAIR – Overexprimované (červeně) a underexprimované (modře) geny u klonu E4 ve dnu 60 vs. kontrolní skupina

Gen	Změna exprese v násobcích	Gen	Změna exprese v násobcích	Gen	Změna exprese v násobcích
ATM	4,93	MPG	2,62	APEX2	-2,1
ATXN3	5,73	MRE11A	2,32	DDB2	-2,43
BRCA2	2,42	MSH5	2,45	FEN1	-2,2
CCNO	11,98	MUTYH	2,75	PARP1	-2,22
ERCC1	2,02	POLL	2,52	POLD3	-2,03
ERCC5	2,65	RAD50	2,14	RAD51	-3,17
LIG4	4,16	RAD51B	2,99	RPA1	-2,07
MLH1	5,14	SMUG1	3,03	XRCC6	-2,28



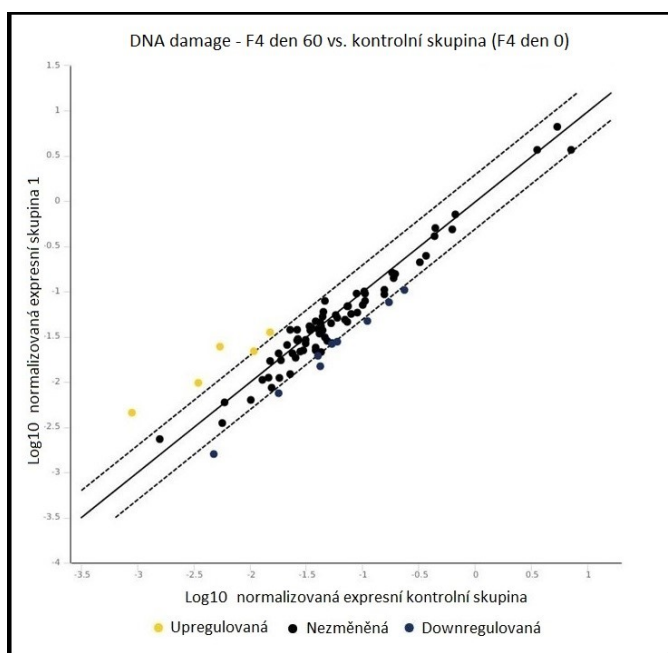
Výsledková tabulka 16

DNA REPAIR – Overexprimované (červeně) a underexprimované (modře) geny u klonu E4 ve dnu 75 vs. kontrolní skupina

Gen	Změna exprese v násobcích	Gen	Změna exprese v násobcích	Gen	Změna exprese v násobcích
ATM	5,25	EXO1	-3,94	RAD51C	-2,44
ATXN3	3,27	FEN1	-3,07	RPA1	-2,34
ERCC6	2,24	LIG1	-2,42	RPA3	-2,32
LIG4	2,41	MSH2	-2,12	TDG	-2,12
MSH5	3,03	OGG1	-2,2	UNG	-2,78
NEIL1	2,22	PARP1	-2,59	XRCC4	-2,06
PARP3	2,22	POLD3	-2,19	XRCC5	-2,02
RAD51B	3,72	RAD23A	-2,15	XRCC6	-3,09
RAD52	2,18	RAD23B	-2,16		
APEX2	-2,11	RAD51	-3,04		

5.1.5.4 KCL-22 CD38- Klon F4 (E255K)

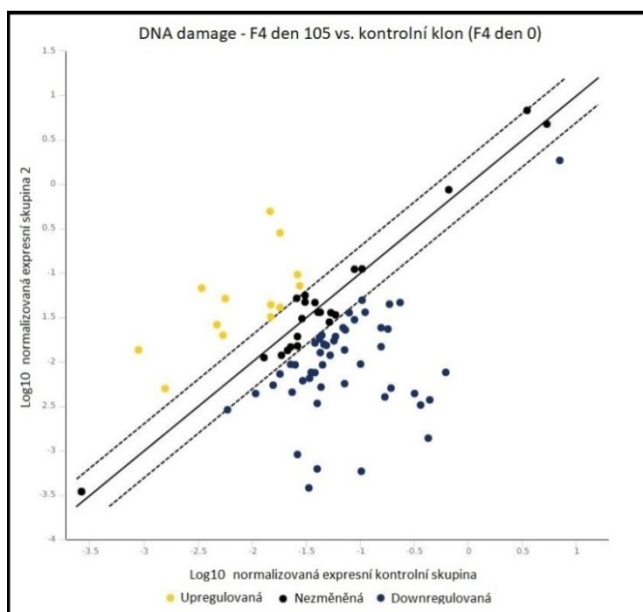
U klonu F4 došlo k získání mutace BCR-ABL1 E255K.



Výsledková tabulka 17

DNA DAMAGE – Overexprimované (červeně) a underexprimované (modře) geny u klonu F4 ve dnu 60 vs. kontrolní skupina

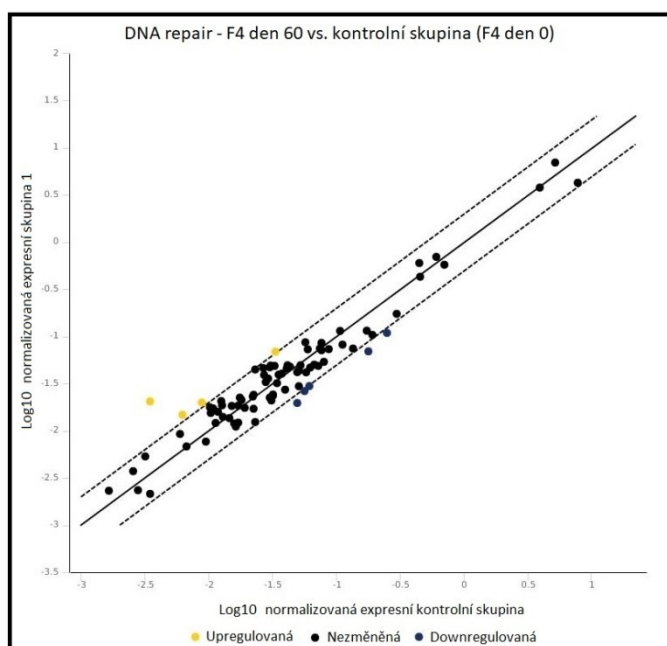
Gen	Změna exprese v násobcích	Gen	Změna exprese v násobcích	Gen	Změna exprese v násobcích
ATM	4,59	BARD1	-2,06	PARP1	-2,25
BBC3	2,85	CDC25A	-2,83	RAD9A	-2,39
MLH1	5,13	EXO1	-2	RBBP8	-2,13
RAD51B	2,01	GADD45A	-2,97	RPA1	-2,35
TP53	2,36	LIG1	-2,03	XRCC6	-2,23



Výsledková tabulka 18

DNA DAMAGE – Overexprimované (červeně) a underexprimované (modře) geny u klonu F4 ve dnu 105 vs. kontrolní skupina

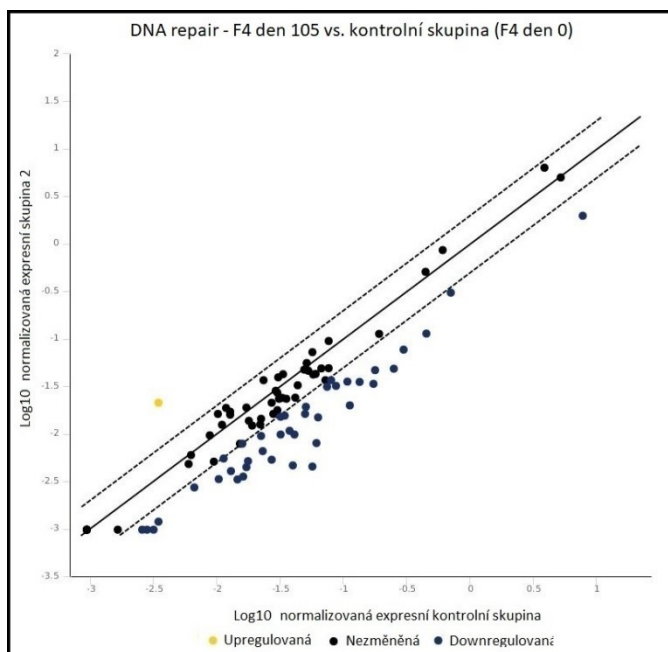
Gen	Změna exprese v násobcích	Gen	Změna exprese v násobcích	Gen	Změna exprese v násobcích
ATM	3,72	CIB1	-7,81	PMS1	-88,95
BBC3	19,63	CSNK2A2	-2,74	PNKP	-3,22
BRIP1	2,58	DDB1	-73,26	PPP1R15A	-8,43
DDB2	2,14	DDIT3	-5,19	RAD1	-2,21
GADD45A	5,52	ERCC1	-3,17	RAD17	-2,49
MLH1	15,3	ERCC2	-2,94	RAD18	-2,35
PPM1D	33,71	EXO1	-3,38	RAD21	-118,19
RAD9A	2,27	FANCA	-64,22	RAD51	-4,48
RNF168	3,62	FANCD2	-2,31	RAD51B	-2,47
TP53	2,92	FEN1	-4,24	RNF8	-4,84
XPA	3,17	H2AFX	-81,86	RPA1	-3,06
XPC	11,2	HUS1	-2,05	SIRT1	-5,26
XRCC2	15,73	MAPK12	-3	SMC1A	-10,52
XRCC3	9,16	MBD4	-12,77	SUMO1	-3,35
APEX1	-311,91	MCPH1	-29,34	TOPBP1	-3,06
ATRIP	-2,42	MDC1	-2,88	TP53BP1	-175,46
ATRX	-4,84	MPG	-2,94	UNG	-2,12
BARD1	-11,75	MSH2	-10,67	XRCC1	-5,33
BAX	-38,19	MSH3	-2,86	XRCC6	-42,37
BLM	-4,64	NBN	-6,48		
CDC25A	-2,34	PARP1	-5,05		
CHEK2	-5,05	PCNA	-111,82		



Výsledková tabulka 19

DNA REPAIR – Overexprimované (červeně) a underexprimované (modře) geny u klonu F4 ve dnu 60 vs. kontrolní skupina

Gen	Změna exprese v násobcích	Gen	Změna exprese v násobcích	Gen	Změna exprese v násobcích
ATM	5,89	LIG1	-2,15	XRCC6	-2,57
ATXN3	2,26	OGG1	-2,52	OGG1	-2,52
RFC1	2,07	PARP1	-2,29		
SMUG1	2,37	RAD51	-2,06		



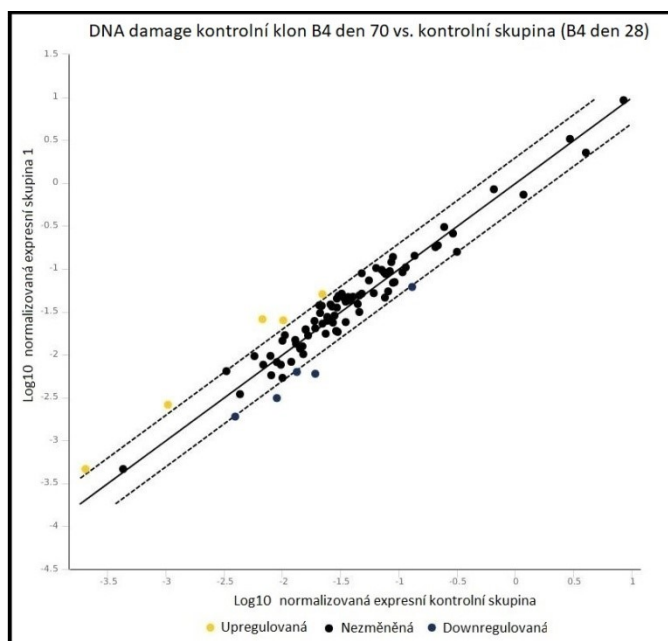
Výsledková tabulka 20

DNA REPAIR – Overexprimované (červeně) a underexprimované (modře) geny u klonu F4 ve dnu 105 vs. kontrolní skupina

Gen	Změna exprese v násobcích	Gen	Změna exprese v násobcích	Gen	Změna exprese v násobcích
ATM	6,08	MSH2	-2,74	RAD54L	-3,82
APEX1	-4,01	MSH6	-2,39	RPA1	-3,82
APEX2	-2,94	MUTYH	-2,06	RPA3	-4,21
BRCA1	-4,16	NEIL1	-2,63	TOP3A	-3,52
BRCA2	-3,11	NTHL1	-3,49	TOP3B	-2,11
BRIP1	-5,12	OGG1	-3,06	UNG	-5,64
DDB1	-3,88	PARP1	-5,15	XRCC2	-3,42
ERCC2	-2,63	PARP2	-3,26	XRCC3	-2,45
ERCC4	-2,02	POLD3	-4,42	XRCC5	-2,31
ERCC8	-2,37	POLL	-2,88	XRCC6	-3,82
EXO1	-8,6	PRKDC	-3,04	XRCC6BP1	-3,22
FEN1	-5,19	RAD51	-7,7		
LIG1	-12,51	RAD51C	-4,58		
MLH1	-3,26	RAD51D	-2,23		

Výše popsaná analýza změn genové exprese u rezistentních klonů B8-T315I, B10-Y253H, E4-WT a F4-E255K vygenerovala poměrně velké množství genů měnících svoji expresi v průběhu vyvíjení rezistence na TKI. Mezi jednotlivými klony jsme navíc pozorovali poměrně značnou heterogenitu, pokud jde o spektrum těchto genů. Při následné analýze jsme chtěli zjistit, které z výše uvedených změn genové exprese se specificky týkají procesu rozvíjení rezistence na TKI, a které lze naopak pozorovat v průběhu času i u klonů, které rezistenci nevyvíjí. Proto jsme se rozhodli použít RT² Profiler PCR arrays panely (QIAGEN) na analýzu genové exprese ze vzorků RNA izolovaných ve dnech 0 a 70 ze tří kontrolních CD38- klonů (B4, B5 a B8), které rostly v médiu bez IM a nevyvíjely rezistenci. Zaměřili jsme se na změnu genové exprese mezi těmito časovými body, přičemž kritéria signifikance změny byla stejná jako při analýze u rezistentních klonů. Na základě zjištění vysoké reproducibility výsledků předchozích analýz exprese u klonů vyvíjejících rezistenci a z důvodů nemalé finanční náročnosti již tyto analýzy nebyly prováděny v duplikátech.

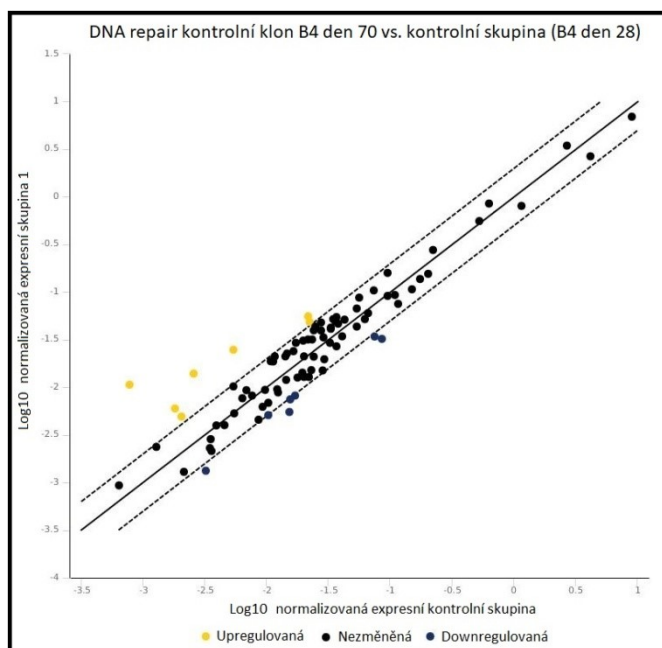
5.1.5.5 KCL-22 CD38- Kontrolní klon B4



Výsledková tabulka 21

DNA DAMAGE – Overexprimované (červeně) a underexprimované (modře) geny u kontrolního klonu B4 ve dnu 70 vs. kontrolní skupina

Gen	Změna exprese v násobcích	Gen	Změna exprese v násobcích	Gen	Změna exprese v násobcích
ATM	3,83	XPA	2,51	PCNA	-2,1
BARD1	2,48	CDC25A	-2,85	PPM1D	-3,21
CDK7	2,29	CDC25C	-2,09		
GADD45G	2,28	EXO1	-2,12		

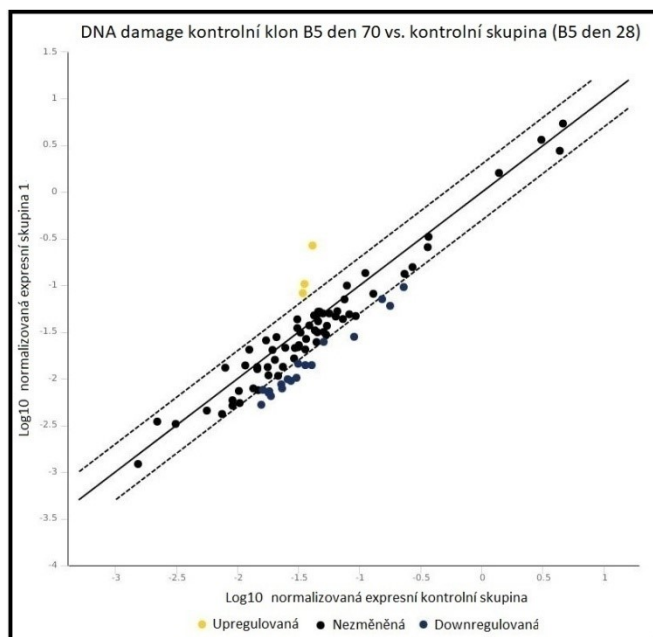


Výsledková tabulka 22

DNA REPAIR – Overexprimované (červeně) a underexprimované (modře) geny u kontrolního klonu B4 ve dnu 70 vs. kontrolní skupina

Gen	Změna exprese v násobcích	Gen	Změna exprese v násobcích	Gen	Změna exprese v násobcích
ATM	4,59	TP53BP1	2,39	PCNA	-2,78
BRCA1	2,15	XPA	5,42	PPP1R15A	-2,09
HUS1	13,62	DDB2	-2,66	RAD17	-2,09
RAD9A	2,56	DDIT3	-2,03		
RNF8	3,27	ERCC1	-2,21		

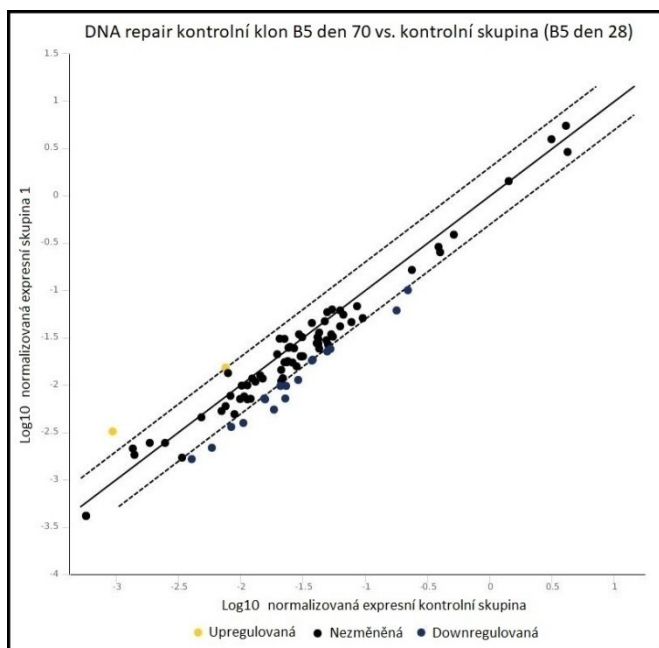
5.1.5.6 KCL-22 CD38- Kontrolní klon B5



Výsledková tabulka 23

DNA DAMAGE – Overexprimované (červeně) a underexprimované (modře) geny u kontrolního klonu B5 ve dnu 70 vs. kontrolní skupina

Gen	Změna exprese v násobcích	Gen	Změna exprese v násobcích	Gen	Změna exprese v násobcích
CDKN1A	6,54	CDC25A	-2,89	OGG1	-2,95
DDIT3	2,39	CHEK1	-2,91	PARP1	-2,93
PPP1R15A	2,93	CHEK2	-2,16	PCNA	-2,39
ABL1	-2,14	EXO1	-2,62	RAD51	-2,95
ATRIP	-2,97	FANCA	-2,89	RPA1	-2,03
BBC3	-2,51	FANCD2	-2,6	XRCC2	-2,13
BLM	-2,57	LIG1	-2,46		

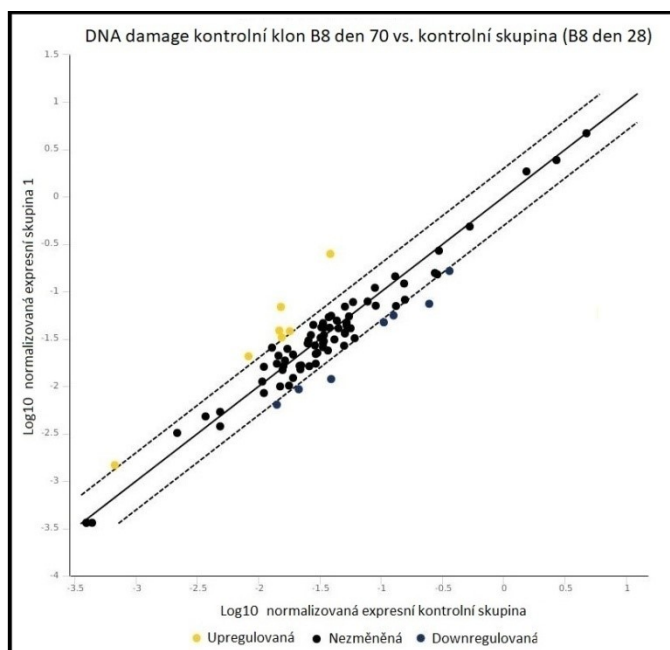


Výsledková tabulka 24

DNA REPAIR – Overexprimované (červeně) a underexprimované (modře) geny u kontrolního klonu B5 ve dnu 70 vs. kontrolní skupina

Gen	Změna exprese v násobcích	Gen	Změna exprese v násobcích	Gen	Změna exprese v násobcích
ERCC6	2,02	LIG1	-2,15	RAD51	-2,14
MSH4	3,42	LIG3	-2,06	RAD51C	-2,34
BRCA1	-2,37	MLH1	-2,45	TOP3A	-2,24
BRIP1	-3,19	NEIL3	-3,35	UNG	-2,06
DDB1	-2,2	OGG1	-2,58	XRCC3	-2,72
ERCC2	-2,18	PARP1	-2,92		
FEN1	-2,18	RAD23A	-2,65		

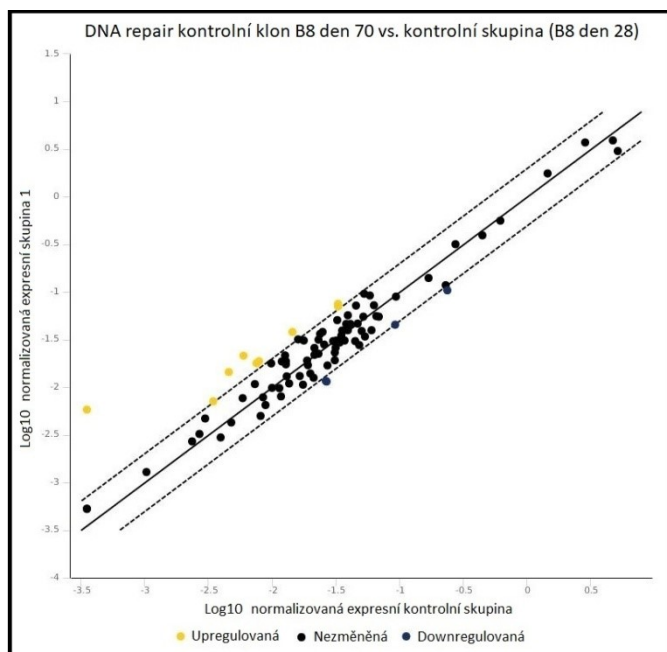
5.1.5.7 KCL-22 CD38- Kontrolní klon B8



Výsledková tabulka 25

DNA DAMAGE – Overexprimované (červeně) a underexprimované (modře) geny u kontrolního klonu B8 ve dnu 70 vs. kontrolní skupina

Gen	Změna exprese v násobcích	Gen	Změna exprese v násobcích	Gen	Změna exprese v násobcích
ATM	2,51	REV1	2,13	MDC1	-2,27
CDKN1A	6,45	XPA	2,2	OGG1	-3,29
DDIT3	2,64	CDC25C	-2,2	PARP1	-3,34
MRE11A	2,11	EXO1	-2,28	RPA1	-2,23
PPP1R15A	4,53	H2AFX	-2,2		



Výsledková tabulka 26

DNA REPAIR – Overexprimované (červeně) a underexprimované (modře) geny u kontrolního klonu B8 ve dnu 70 vs. kontrolní skupina

Gen	Změna exprese v násobcích	Gen	Změna exprese v násobcích	Gen	Změna exprese v násobcích
ATM	2,38	RAD51B	2,38	MRE11A	-2,3
BBC3	2,27	SUM01	2,14	RAD17	-2,35
HUS1	16,56	XPA	3,58	RBBP8	-2,03
MBD4	3,14	XPC	2,06		
RAD50	2,64	DDB1	-2,25		

5.1.5.8 Výsledky analýzy změn genové exprese

Výsledky celé analýzy jsme vyhodnotili následujícím způsobem: Pro každý jednotlivý rezistentní klon B8-T315I, B10-Y253H, E4-WT a F4-E255K jsme zaznamenali geny, jejichž exprese se oproti kontrolní skupině (den 0) konzistentně zvyšovala (Výsledková tabulka 27) nebo konzistentně snižovala (Výsledková tabulka 28) v obou analyzovaných časových bodech. Geny byly zaznamenány separátně pro oba panely RT² Prolifer PCR Array Human DNA Damage Signaling Pathway a pro RT² Prolifer PCR Array Human DNA Repair. Do stejných Výsledkových tabulek jsme obdobně zaznamenali geny, jejichž exprese byla buď signifikantně zvýšená aspoň u 2 ze 3 kontrolních klonů (Výsledková tabulka 27), nebo signifikantně snižovaná aspoň u 2 ze 3 kontrolních klonů (Výsledková tabulka 28). Nyní jsme z tabulek identifikovali geny, které splňují dvě následující podmínky: 1) jsou uvedeny jako konzistentně signifikantně zvýšené (nebo analogicky konzistentně signifikantně snižené) minimálně u 3 ze 4 studovaných klonů vyvíjejících rezistenci na TKI v jednom nebo v obou panelech a 2) nejsou zároveň v daném panelu uvedeny jako geny se signifikantně zvýšenou (resp. signifikantně sniženou) expresí u kontrolních klonů.

Zvýšenou expresi genu ATM a sníženou expresi genů CDC25A a PCNA vykazovaly jak rezistentní klony, tak i kontrolní klony. Snižovanou expresi genů XRCC6 a PARP1 vykazovaly pouze rezistentní klony a tyto geny proto považujeme za vážné kandidátní geny pro zapojení do procesu rozvíjení rezistence a mutací. Při srovnání genové exprese rezistentních klonů s mutací a bez mutace, jsme nenašli žádný gen unikátní pro rezistentní klon bez mutace, s výjimkou genu FEN1.

V poslední analýze, kterou jsem se zabývala, jsme se zaměřili na hodnocení rozdílné genové exprese mezi rezistentními klony a kontrolními klony dle hodnot Ct, které jsme pro všechny hodnoty normalizovali podle kontrolních genů. Zaznamenali jsme geny, jejichž průměrná exprese pro klony získávající rezistenci vyjádřená v hodnotě $2^{-\Delta CT}$ se v časovém bodě den 60 - 70 lišila od průměrné exprese pro kontrolní klony (den 70) alespoň dvakrát (Výsledková tabulka 29). Tyto geny považujeme za možné kandidáty pro další analýzu jejich role v navozování rezistence a mutageneze u CML.

Výsledková tabulka 27

Výsledky analýzy panelů genové exprese: zaznamenány jsou geny se signifikantně a konzistentně zvýšenou expresí u klonů vyvíjejících rezistenci a u kontrolních klonů.

ZVÝŠENÁ EXPRESE						
B8 DAMAGE (D60+75)	ATM	PPP1R15A	BBC3			
B10 DAMAGE (D75+90)	ATM	DDB2	DDIT3			
E4 DAMAGE (D60+75)	ATM	PPP1R15A	RAD51B			
F4 DAMAGE (D60+105)	ATM	BBC3	MLH1	TP53		
KONTROLNÍ KLONY	ATM	PPP1R15A	DDIT3	CDKN1A	XPA	
B8 REPAIR (D60+75)	ATM	ERCC6	NEIL1			
B10 REPAIR (D75+90)	ATM	ATXN3	ERCC5	ERCC6	LIG4	MRE11A
	MSH5	PARP3	POLL	RAD51B	RAD52	XPA
E4 REPAIR (D60+75)	ATM	ATXN3	LIG4	MSH5	RAD51B	
F4 REPAIR (D60+105)	ATM					
KONTROLNÍ KLONY	ATM	HUS1	XPA			

Výsledková tabulka 28

Výsledky analýzy panelů genové exprese: zaznamenány jsou geny se signifikantně a konzistentně sníženou expresí u klonů vyvíjejících rezistenci a u kontrolních klonů. Červeně jsou vyznačeny geny, jejichž exprese se signifikantně a konzistentně mění v daném panelu pouze pro klony získávající rezistenci a nikoliv pro kontrolní klony.

SNÍŽENÁ EXPRESE						
B8 DAMAGE (D60+75)	CDC25A	PCNA	XRCC6			
B10 DAMAGE (D75+90)	CDC25A	PCNA				
E4 DAMAGE (D60+75)	CDC25A	EXO1	FEN1	PARP1	PCNA	RAD51
	UNG	XRCC6				
F4 DAMAGE (D60+105)	CDC25A	BARD1	PARP1	XPA1	RPA1	XRCC6
	EXO1					
KONTROLNÍ KLONY (B4/5/8))	CDC25A	CDC25C	OGG1	PARP1	PCNA	XRPA1
	EXO1					
B8 REPAIR (D60+75)	RAD23A					
B10 REPAIR (D75+90)	PARP1					
E4 REPAIR (D60+75)	APEX2	FEN1	PARP1	POLD3	RAD51	RPA1
	XRCC6					
F4 REPAIR (D60+105)	LIG4	OGG1	PARP1	RAD51	XRCC6	
KONTROLNÍ KLONY	RAD17					

Výsledková tabulka 29

Hodnoty $2^{-\Delta CT}$ charakterizující signifikantně odlišnou míru exprese genů v jednotlivých rezistentních a kontrolních klonech a jejich průměry.

DNA DAMAGE + REPAIR DEN 60-45 hodnoty $2^{-\Delta CT}$										
	B8	B10	E4	F4	PRŮMĚR KLONŮ		B5	B8	B4	PRŮMĚR KONTROL
BBC3	0,003	0,006	0,002	0,010	0,005		0,007	0,016	0,018	0,013
CDC25A	0,014	0,022	0,015	0,015	0,016		0,007	0,012	0,003	0,007
CDKN1A	0,026	0,015	0,010	0,038	0,022		0,269	0,250	0,104	0,207
FEN1	0,126	0,092	0,086	0,0141	0,110		0,031	0,041	0,046	0,039
H2AFX	0,382	0,483	0,359	0,489	0,428		0,157	0,166	0,158	0,159
PCNA	0,247	0,255	0,155	0,250	0,226		0,096	0,152	0,062	0,103
UNG	0,062	0,069	0,055	0,079	0,066		0,016	0,023	0,025	0,021
BARD1	0,016	0,012	0,012	0,015	0,013		0,002	0,005	0,002	0,008
BAX	0,030	0,036	0,015	0,039	0,029		0,007	0,014	0,005	0,008
DDB1	0,033	0,026	0,024	0,027	0,027		0,012	0,012	0,006	0,009
DDB2	0,161	0,088	0,081	0,115	0,111		0,024	0,034	0,032	0,03
FANCA	0,011	0,009	0,010	0,005	0,008		0,002	0,003	0,002	0,002

6 Diskuze

Cílem mé diplomové práce bylo identifikovat geny z okruhu genů účastníků se reakcí na poškození DNA a oprav těchto poškození, jejichž exprese se dynamicky mění během vzniku rezistence na TKI a rozvoje mutací v BCR-ABL1, a které by tedy potenciálně mohly s těmito procesy souviset. Pracovala jsem s modelem buněčné linie KCL-22 představující CML v blastickém zvratu. Tento model na rozdíl od většiny buněčných linií CML vykazuje poměrně nízkou citlivost vůči imatinibu a rychlý relaps spojený s akvizicí mutací v BCR-ABL1, což jej činí blízkým reálným situacím z klinické praxe progradované CML (Yuan *et al.*, 2010).

Předpokladem naší práce bylo zjištění, že buňky KCL-22 mohou získávat mutace v BCR-ABL1 *de novo* po vystavení imatinibu (Yuan *et al.*, 2010), což bylo potvrzeno i během ustavení námi dále analyzovaných rezistentních klonů. Na základě literatury a našich vlastních předchozích pozorování jsme vznik rezistence studovali jednak v závislosti na expresi povrchového markeru CD38, tak rovněž v závislosti na stáří buněčné kultury. Bylo popsáno, že indukovaná zvýšená exprese molekuly CD38 vystavením buněk ATRA zablokovala rozvoj BCR-ABL1 mutací a rezistence na TKI v KCL-22 vystavených imatinibu (Wang *et al.*, 2014). V naší studii jsme expresi CD38 neindukovali vnějším působením ATRA, ale zaměřili jsme se na rozdíly mezi přirozeně se vyskytujícími CD38+ (tvořících cca 0,5-5% buněk v kultuře) a CD38- (tvořících cca 95-99% buněk v kultuře) buňkami v kulturách KCL-22. Zjistili jsme, že CD38+ buňky z časné kultury KCL-22 vykazovaly jednak signifikantně vyšší citlivost na imatinib spojenou s nižší mírou proliferace a vyšší mírou apoptózy, ale také nižší klonogenicitu i bez přítomnosti imatinibu ve srovnání s CD38- buňkami. Tyto výsledky se tedy jeví v souladu s výše uvedenými závěry (Wang *et al.* 2014). Je ovšem třeba brát v potaz, že buněk resp. klonů izolovaných z pozdní kultury KCL-22 jsme nepozorovali rozdíly v klonogenicitě, apoptóze ani proliferaci mezi CD38+ a CD38- buňkami. Počet klonů vyrostlých z časné kultury jeví trend nepřímé úměrnosti ke koncentraci IM, které byly buňky vystaveny, zatímco u pozdní kultury jsme tento trend nezaregistrovali. Na základě MTT testu jsme zjistili, že pozdní kultura (> 150 pasáží) KCL-22 vykazuje zřetelně vyšší

rezistenci na působení imatinibu ($IC_{50} = 0,635 \text{ uM}$) oproti časně kultuře (< 20 pasáží) KCL-22 ($IC_{50} = 0,382 \text{ uM}$). Vedle toho pozdní kultura KCL-22 vykazovala celkově sníženou expresi CD38. Lze tedy předpokládat, že během přirozené evoluce CML dochází k změnám mechanismů rezistence na TKI, resp. upevnění určitých mechanismů rezistence oproti jiným.

Postupným zvyšováním koncentrace IM působícího na jednotlivé klony jsme získali 4 klony z časně kultury (B8-T315I, B10-Y253H, E4-WT a F4-E255K) a 2 klony z pozdní kultury KCL-22 vykazující stabilní rezistenci na 4 uM IM. Všechny tyto klony vycházely z CD38- buněk, což opět v souladu s výše uvedenou prací (Wang *et al.*, 2014) svědčí o klíčové roli této molekuly v procesu rozvoje rezistence u CML. Objev mutací T315I, E255K a Y253H v rezistentních klonech nebyl překvapivý, neboť tyto tři mutace vykazují nejvyšší frekvenci ze všech mutací v CML (Apperley *et al.*, 2007) a vysokou rezistenci na imatinib (O'Hare *et al.*, 2007). Jde zároveň o mutace identifikované jako získané *de novo* v rezistentních klonech či kulturách v předchozích pracích (Yuan *et al.*, 2010) i v dosavadních experimentech školícího pracoviště. U čtvrtého rezistentního klonu (E4-WT) jsme mutované transkripty BCR-ABL1 nedetkovali, nicméně při dalších analýzách (data nejsou v rámci diplomové práce prezentována) jsme u něj detkovali specifické, nově získané mutace v genech ATRX, RUNX1 a N-RAS a lze předpokládat, že tyto mutace mohou přispívat k rezistenci klonu (Zhao *et al.*, 2012; Koschmann *et al.*, 2016; Guo *et al.*, 2018).

Dále jsme vycházeli z toho, že rozvoj mutací může být ovlivněn stářím kultury, kde frekvence získávání mutací ve starší kultuře významně klesá (Yuan *et al.*, 2010). Naše výsledky v tomto směru nejsou jednoznačné, neboť u obou rezistentních klonů z pozdní kultury jsme detkovali 50 % mutovaných transkriptů T315I (Data nejsou v rámci diplomové práce prezentována). Nižší senzitivita pozdní kultury vůči IM nicméně naznačuje, že tyto buňky po vystavení IM preferenčně resp. primárně využívají mechanismy rezistence nespojené s mutacemi, dokud hladina IM nedosáhne určité, pro jejich růst výrazně detrimentalní úrovně. Tento závěr je v souladu s pozorováním, že buňky CML disponují širší paletou mechanismů rezistence, které mohou využívat v závislosti na koncentraci a typu TKI, kterému jsou vystaveny. K těmto mechanismům patří zvýšení exprese BCR-ABL1, které

obvykle předchází získání mutací (Tang *et al.*, 2011). V naší práci jsme skutečně pozorovali, že klony CML reagovaly na postupné zvyšování koncentrace působícího IM a na kultivaci v tomto prostředí overexpresí BCR-ABL1. Naše data nicméně neukázala signifikantní rozdíl v hladině exprese BCR-ABL1 u klonů, které následně vyvinuly mutace a které je nevyvinuly, nevyjímaje rezistentní nemutovaný klon E4. Stejně tak jsme nepotvrdili, že by objevení mutací v BCR-ABL1 bylo provázeno poklesem exprese BCR-ABL1 (jeden mechanismus rezistence „předal štafetu“ jinému), jak bylo popsáno (Tang *et al.*, 2011). Exprese BCR-ABL1 v jednotlivých klonech vykazovala v průběhu času kolísání, nicméně zůstávala celkově výrazně overexprimovaná.

V hlavní části své diplomové práce jsem se zaměřila na geny účastnící se detekce poškození DNA a jejich reparací, které by mohly hrát roli v rezistenci na IM. Možná účast BCR-ABL1 ve vlastní mutagenезi nebo přímo v navození mutačního fenotypu buňky byla již uvažována a intenzivně studována. Mezi navrhované mechanismy, jak BCR-ABL1 přispívá ke vzniku mutací, patřila např. inhibice mismatch oprav (Stoklosa *et al.*, 2008), změna exprese BRCA1 (Deutsch *et al.*, 2003), zpomalení oprav DSB přes rozbití kontrolního komplexu ATR (Dierov *et al.*, 2004), nebo ovlivnění NHEJ (Deutsch *et al.*, 2001), ale získaná data nebyla často konkluzivní ani vzájemně kompatibilní (Dierov *et al.*, 2009).

V této práci jsem změřila expresi 84 genů u 4 rezistentních klonů (B8-T315I, B10-Y253H, E4-WT a F4-E255K) ve třech časových bodech pomocí dvou expresních panelů od firmy Qiagen. Den 0 představoval čas, ve kterém jsme klony vystavili 0,004 μM IM. Genovou expresi jsme dále studovali v době, kdy jsme detekovali zastoupení mutace v nízkém procentu (v prostředí 0,4 μM IM ve dni 60–75) a dále v časovém bodě, kdy již došlo k plnému rozvinutí mutace BCR-ABL1 ve vysoké hladině (v prostředí 0,4 μM IM ve dni ≥ 75) – stejné časové body byly zvoleny i pro analýzu klonu E4, který mutace nevyvinul. Míru genové exprese a její změnu u jednotlivých rezistentních klonů jsme porovnávali s kontrolními klony, které nebyly vystaveny imatinibu a nevyvinuly rezistenci. Zjistili jsme, že spektrum genů, které mění svoji expresi mezi počátkem analýzy (den 0) a časem navození resp. definitivního ustavení rezistence spojené s mutacemi, se u jednotlivých

rezistentních klonů poměrně liší. Celkově jsme identifikovali pouze 5 genů, jejichž exprese se konzistentě (tj. jak ve dni 60–75, tak ve dni ≥ 75) signifikantně zvýšila, nebo se konzistentně signifikantně snížila v analýze ve zvoleném panelu alespoň u 3 ze 4 studovaných klonů. Šlo o geny ATM, CDC25A, PCNA, XRCC6 a PARP1. Poměrně překvapivě jsme zjistili, že tři z takto identifikovaných genů ovšem mění svoji expresi také v kontrolních klonech nevystavených imatinibu. Změnu exprese těchto genů tedy nemůžeme spojovat s ustavením rezistence a rozvojem mutací, ale spíše s časovým průběhem kultivace buněk, resp. klonů KCL-22 jako takových. Navíc jsme nepozorovali ani odlišné profily genů měnících svoji expresi u rezistentních klonů, které vyvinuly mutace (B8-T315I, B10-Y253H, F4-E255K), a klonem, který mutace nevyvinul (E4-WT). Signifikantní a konzistentní snížení exprese specifické pro klony získávající rezistenci nicméně vykazovaly geny XRCC6 a PARP1.

Gen XRCC6 kóduje protein Ku70. Ve formě heterodimeru se následně s proteinem Ku80 se vážou na konce dvouřetězcových zlomů DNA a slouží jako základ pro vazbu dalších proteinů potřebných pro NHEJ. Na možnou zásadní roli Ku70 v získávání mutací v KD BCR-ABL1 upozornila již řada prací. Byla popsána vyšší expresi Ku70 v CML buňkách oproti normálním buňkám kostní dřeně a také vyšší expresi Ku70 v blastické krizi oproti chronické fázi, což naznačuje úlohu tohoto proteinu v navození genomové nestability (Chengcheng *et al.*, 2008). Přesnější vymezení role tohoto molekulárního mechanismu je však stále předmětem intenzivního studia. V některých pracích bylo popsáno, že se exprese Ku70 zvyšuje při mutagenезi KD BCR-ABL1 a mírné snížení exprese Ku70 zcela blokuje získávání mutací, zatímco výrazný genový knock-down vede k apoptóze leukemických buněk (Wang *et al.*, 2013). To by naznačovalo, že za mutagenезi BCR-ABL1 může být zodpovědná zvýšená aktivace chybující NHEJ dráhy. Jiné práce ale neukázaly, že by aktivita, resp. exprese BCR-ABL1 měla vliv na expresi Ku70 v buňkách CML (Deutsch *et al.*, 2001; Sallmyr *et al.*, 2008). V nedávné době byl poodhalen klíčový význam posttranslačních modifikací Ku70 a vazeb tohoto proteinu v komplexu s modifikačními enzymy SIRT1 a LSD1, které rozhodují o iniciaci nebo naopak zablokování případné mutagenезe (Roth *et al.*, 2016). Právě SIRT1 může být pravděpodobným spojovacím článkem mezi expresí CD38 a mutagenезí spojenou

s rolí Ku70 (Wang *et al.*, 2014), nicméně v naší práci jsme změny exprese SIRT1 během navození rezistence a získání mutací nezaznamenali. Naše výsledky ukazují, že exprese Ku70 byla během procesu mutagenese snížena oproti kontrolním klonům buněk KCL-22. Snížená exprese Ku70 byla asociována s chromozomální nestabilitou a genovou nestabilitou u kolorektálního karcinomu a karcinomu děložního čípku (Lloret *et al.*, 2009; Beggs *et al.*, 2012). Vysvětlením může být, že snížení exprese Ku70 vede k preferenci nekanonické (alternativní) dráhy NHEJ, která se opírá o PARP1 a vyznačuje se ještě vyšší mírou chybovosti oprav poškození DNA (Rassol *et al.*, 2008). V naší analýze byla nicméně exprese PARP1 u klonů vyvíjejících mutace a rezistenci rovněž downregulovaná. To je na první pohled v rozporu s jinými publikacemi, ve kterých popsali vyšší expresi PARP1 u CML linie K562 rezistentní na imatinib (Tobin *et al.*, 2013). Na druhou stranu může být zajímavé, že na imatinib rezistentní linie K562 nikdy nevyvíjí mutace v BCR-ABL1 (Tang *et al.*, 2011). Na in vitro modelech savčích buněk bylo ukázáno, že nízká exprese PARP1 při snížené expresi Ku70 vede k snížení efektivity spojování konců a dalšímu omezení reparačních schopností buněk (Mansour *et al.*, 2010; Mansour *et al.*, 2013). Každopádně je zřejmé, že objasnění role XRCC6/Ku70 a PARP1 v mutagenезi BCR-ABL1 u CML bude vyžadovat další studium.

Na základě diferenciální exprese v době rezistence na IM spojené s mutacemi oproti kontrolním genům jsme vytipovali dalších 12 genů účastnících se reakcí na poškození DNA a jejich oprav, které by mohly hrát roli v navození rezistence na TKI. Je mezi nimi i gen FEN1, jehož exprese se specificky, konzistentně a signifikantně snížila v průběhu vývoje rezistence u klonu E4 bez mutace v BCR-ABL1. Význam této skutečnosti zůstává pro tuto chvíli nejasný. Analýza neidentifikovala jasný rozdíl v genové expresi u rezistentních klonů s mutacemi (B8-T315I, B10-Y253H a F4-E255K) a bez mutací (E4-WT). Získaná data tvoří v tomto případě pouze surový materiál pro další analýzy. Na základě zjištění, že v klonech dochází ke změnám exprese řady genů v čase bez ohledu na to, zda jsou vystaveny IM a vyvíjejí rezistenci, a že expresní profily jednotlivých klonů jsou poměrně heterogenní, bude potřeba změřit další kontrolní klony a rovněž bude dobré se podívat na expresi

studovaných genů v klonech, které byly vystaveny IM a rostly při 0,4 μ M IM (bez mutace), ale nebyly schopny přežít ve 4 μ M IM.

Tato práce je součástí dlouhodobého projektu zaměřeného na objasnění molekulárních, farmakogenetických a epigenetických mechanismů rezistence na TKI u CML. Vedle mechanismů rezistence spojených s mutacemi v KD BCR-ABL1 se projekt zaměřuje i na další mechanismy rezistence, které jsou BCR-ABL1 nezávislé. Jedním z výstupů práce by mohla být identifikace genů, jejichž produkty by bylo možné terapeuticky cílit ve snaze zabránit rozvoji mutací v BCR-ABL1. Bylo ukázáno, že rozvoj mutací a rezistence na TKI lze inhibovat pomocí ATRA (Wang *et al.* 2014). Také jiní autoři (Ikejiri *et al.* 2018) indukovali silnou expresi CD38 použitím Coleteninu A a tím inhibovali sebeobnovovací kapacity buněk CML. Další taková nalezená látka je Auragofin, který se využívá pro léčbu revmatické artritidy. Bylo zjištěno, že u CML rezistentních buněk divokého typu, ale i u buněk obsahujících mutaci T315I, lze Auragofinem indukovat apoptózu (Chen *et al.*, 2014). Tyto látky mohou nalézt případné terapeutické využití v léčbě progresivních fází CML spojených s rozvojem mutací.

7 Závěr

Předkládaná diplomová práce je zaměřena na mechanismy vzniku rezistence buněk chronické myeloidní leukemie na TKI resp. na imatinib, která je spojena s rozvojem mutací v kinázové doméně BCR-ABL1. Ve své práci jsem s využitím *in vitro* modelu buněk KCL-22 testovala hypotézu, že rozvoj mutací v KD BCR-ABL1 *de novo* po vystavení buněk IM je zprostředkován produkty genů, které reagují na poškození buněčné DNA a opravují je. Hypotéza vycházela z představy, že během akvizice mutací v BCR-ABL1 dochází k deregulaci exprese těchto genů.

1. Ve své práci jsem změřila exprese 84 genů účastnících se reakce buňky na poškození DNA a oprav těchto poškození v různých časových bodech postupného vzniku rezistence a získávání a rozvoje mutací v klonech KCL-22. Identifikovali jsme geny se signifikantní a konzistentní změnou exprese během navozování rezistence. Vedle toho jsme změřili exprese stejných 84 genů v obdobných časových bodech u třech klonů KCL-22, které nebyly vystaveny imatinibu a nevyvíjeli rezistenci na TKI. Zjistili jsme značnou heterogenitu genů měnících signifikantně svoji expresi při navozování rezistence na TKI u jednotlivých klonů. Přes tuto různorodost jsme identifikovali geny XRCC6 a PARP1, jejichž exprese se konzistentně, signifikantně a specificky snižovala v průběhu navození rezistence a rozvoje mutací v KD BCR-ABL1. V případě XRCC6 jde o gen, jehož role v mutagenезi BCR-ABL1 je již řadu let intenzivně zkoumána. Oba geny hrají zásadní roli v kanonické, resp. alternativní cestě oprav dvojřetězcových zlomů nehomologním spojováním konců (NHEJ), což naznačuje, že při vzniku mutací v KD BCR-ABL1 může docházet k deregulaci právě této dráhy.

Pokud je o stanovené specifické dílčí cíle, zjistli jsme:

2. CD38+ buňky u časně kultury vykazovaly ve srovnání s CD38- buňkami z téže kultury statisticky nižší klonogenicitu, nižší míru proliferace a vyšší citlivost k IM (vyšší míru apoptózy). Časná kultura KCL-22 vykazovala vyšší míru proliferace, ale také vyšší citlivost k působení IM ve srovnání s pozdní kulturou. U buněk z pozdní kultury KCL-22 jsme také na rozdíl od buněk z časně kultury

nepozorovali rozdíly v klonogenitivě, míře proliferace a citlivosti k IM mezi CD38+ a CD38- klony.

3. Klony, které vyvinuly rezistenci, nevykazovaly vyšší expresi BCR-ABL1 než klony, které rezistenci nevyvinuly. To může naznačovat, že výše popsané změny exprese v genech XRCC6 a PARP1 jsou nezávislé na aktivitě BCR-ABL1. Exprese BCR-ABL1 jevila stoupající trend s dobou kultivace a zvyšováním koncentrace IM působící na buňky.

Tato diplomová práce vznikala v rámci řešení širšího projektu na pracovišti Oddělení molekulární genetiky ÚHKT majícího za cíl objasnit mechanismy rezistence a mutageneze u buněk CML. Dosažené výsledky navazují na již získaná data a budou využita v rámci skládání komplexnějšího náhledu na tuto problematiku s přesahem do klinické praxe.

8 Seznam použité literatury

Abraham SA, Hopcraft LE, Carrick E, Drotar ME, Dunn K, Williamson AJ, Korfi K, Naguero P, Park LE, Scott MT et al. Dual targeting of p53 and c-MYC selectively eliminates leukaemic stem cells. *Nature*. 2016. Jun 16;534(7607)

* **Agarwal R**, Tafel AA, Kanaar R. DNA double-strand break repair and chromosome translocations. *DNA Repair*. 2006 Sep 8;5(9-10):1075-1081

Apperley 2007. Part I: mechanisms of resistance to imatinib in chronic myeloid leukaemia. *Lancet Oncol*. 2007 Nov;8(11):1018-29

Baccarani M, Deininger MW, Rosti G, Hochhaus A, Soverini S, Apperley JF, Cervantes F, Clark RE, Cortes JT, Guilhot F *et al*. European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. *Blood*. 2013 Aug 8;122(6):872-84

* **Blackford AN and Jackson SP**. ATM, ATR and DNA-PK: The Trinity at the Heart of the DNA Damage Response. *Mol Cell*. 2017 Jun 15;66(6):801-817

Beggs AD, Domingo E, McGregor M, Presz M, Johnstone E, Midgley R, Kerr D, Oukrif D, Novelli M, Abulafi M et al. Loss of expression of the double strand break repair protein ATM is associated with worse prognosis in colorectal cancer and loss of Ku70 expression is associated with CIN. *Oncotarget*. 2012 Nov;3(11):1348-55

Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Andersson MJ, Ardem KC, Blenis J, Greengard ME. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell*. 1999 Mar 19;96(6):857-68

Buchdunger E, Cioffi CL, Law N, Stover D, Ohno-Jones S, Druker BJ, Lydon NB. Abl protein-tyrosine kinase inhibitor STI571 inhibits in vitro signal transduction mediated by c-kit and platelet-derived growth factor receptors. *J Pharmacol Exp Ther*. 2000 Oct;295(1):139-45

Campbell LJ, Patsouris C, Rayeroux KC, Somana K, Januszewicz EH, Szer J. BCR/ABL amplification in chronic myelocytis leukemia blast crisis following imatinib mesylate administration. *Cancer Genet Cytogenet*. 2002 Nov;139(1):30-3

Capdeville R, Buchdunger E, Zimmermann J, Matter A. Glivec (STI571, imatinib), a rationally developed, targeted anticancer drug. *Nat Rev Drug Discov*. 2002 Jul;1(7):493-502

Carlesso N, Frank DA, Griffin JD. Tyrosyl phosphorylation and DNA binding activity of signal transducers and activators of transcription (STAT) proteins on hematopoietic cell lines transformed by Bcr/Abl. *J Exp Med*. 1996 Mar 1;183(3): 811-820

* **Ciccia A and Elledge SJ**. The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol Cell*. 2010 Oct 22;40(2):179-204

Cortes J, Kantarjian HM, Brümmendorf TH, Kim DW, Turkina AG, Shen ZX, Pasquini R, Khoury HJ, Arkin S, Volkert A, Besson N, Abbas R, Wang J, Leip E, Gambacorti-Passerini CB. Safety and efficacy of bosutinib (SKI-606) in chronic phase Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia patients with resistance or intolerance to imatinib. *Blood*. 2011 Oct 27;118(17):4567-76

Cortes JE, Talpaz M, Bixby D, Deininger M, Shah N, Flinn IW, Mauro M, O'Hare T, Hu S, Kan R *et al*. A Phase 1 Trial of Oral Ponatinib (AP24534) In Patients with Refractory Chronic Myelogenous Leukemia (CML) and Other Hematologic Malignancies: Emerging Safety and Clinical Response Finding. *Blood*. 2010;116(21):210

Cortes JE, Kim DW, Pinilla-Ibarz J, le Coutre P, Paquette R, Chuah C, Nicolini FE, Apperley JF, Khoury HJ, Talpaz M, DiPersio *et al*. A Phase 2 Trial of Ponatinib in Philadelphia Chromosome-Positive Leukemias. *N Engl J Med*. 2013 Nov 7;369(19):1783-96

* **David SS**, O'Shea VL, Kundu S. Base-excision repair of oxidative DNA damage. *Nature*. 2007 Jun 21;447(7147):941-50

Deininger M, Buchdunger E, Druker BJ. *Blood*. 2005 Apr 1;105(7):2640-53

Deininger M, O'Brien SG, Guilhot F, Goldman JM, Hochhaus A, Hughes TP, Radich JP, Hakfield AK, Mone M, Filian J, *et al*. International Randomized Study of Interferon Versus STI751 (IRIS) 7-Year Follow-up: Sustained Survival, Low Rate of Transformation and Increased Rate of Major Molecular Response (MMR) in Patients (pts) with Newly Diagnosed Chronic Myeloid Leukemia in Chronic Phase (CMLCP) Treated with Imatinib (IM). *Blood*, 2009;114(22):1126

de Klein A, van Kessel AG, Grosveld G, Bartram CR, Hagemeijer A, Bootsma D, Spurr NK, Heisterkamp N, Groffen J, Stephenson JR. A cellular oncogene is translocated to the Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. *Nature* 1982;300(5894):765-7

Deutsch E, Jarrousse S, Buet D, Dugry A, Bonnet ML, Vozenin-Brotons MC, Guilhot F, Turhan AG, Freunteun J, Bourhis J. Down-regulation of BRCA1 in BCR-ABL-expressing hematopoietic cells. *Blood*. 2003 Jun 1;101(11):4583-8

Deutsch E, Dugray A, Abdulkarim B, Marangoni E, Maggiorella L, Vaganay S, M'Kacher R, Rasy SD, Eschwege F, Vainchenker W *et al*. BCR-ABL down-regulates the DNA repair protein DNA-PKcs. *Blood*. 2001 Apr 1;97(7):2084-90

Dierov J, Sanchez PV, Burke BA, Padilla-Nash H, Putt ME, Ried T, Caroll M. BCR/ABL1 induces chromosomal instability after genotoxic stress and alters the cell death threshold. *Leukemia*. 2009 Feb;23(2):279-86

- * **Duncan L. S**, Burthem J., Whetton AD. Molecular pathogenesis of chronic myeloid leukaemia. *Expert Reviews in Molecular Medicine* 2003;5(27):1-27.
- Druker BJ**, Sawyers CL, Kantarjian H, Resta DJ, Reese SF, Ford JM, Capdeville R, Talpaz M. Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome. *N Engl J Med*. 2001 Apr5;344(14):1038-42
- * **Jabbour E and Kantarjian H**. Chronic Myeloid Leukemia: 2016 update on diagnosis, therapy and monitoring. *Am J Hematol*. 2016 Feb;91(2):252-65
- Faber E.**, Indrák K., et al., Chronická myeloidní leukémie. 1. vyd. Praha: Galén, 2010. 234 s. ISBN 978-80-7262-680-9
- Fell VL and Schild-Poulter C**. Ku regulates signaling to DNA damage response pathways through the Ku70 von Willebrand A domain. *Mol Cell Biol*. 2012 Jan;32(1):76-87
- Frank DA and Varticovski L**. BCR/abl Leads to the constitutive activation of Stat proteins, and shares an epitope with tyrosine phosphorylated Stats., *Leucemia*, 1996 Nov;10(11):1724-30
- Galimberti S**, Cervetti G, Guerrini F, Testi R, Pacini S, Fazzi R, Simi P, Petrini M. Quantitative molecular monitoring of BCR-ABL and MDR1 transcripts in patients with chronic myeloid leukemia during Imatinib treatment. *Cancer Genet Cytogenet*. 2005 Oct 1;162(1):57-62
- Gambacorti-Passerini CB**, Zucchetti M, Russo D, Frapolli R, Verga M, Bungaro S, Tornaghi L, Rossi F, Pioltelli P, Pogliani E. Alpha1 acid glykoprotein binds to imatinib (STI571) and substantially alters its pharmacokinetics in chronic myeloid leukemia patients. *Clin Cancer Res*. 2003 Feb;9(2):625-32
- Gambacorti-Passerini CB**, Gunby RH, Piazza R, Galletta A, Rostagno R, Scapozza L. Molecular mechanisms of resistance to imatinib in Philadelphia-chromosome-positive leukaemias. *Lancet Oncol*. 2003 Feb;4(2):75-85
- * **Geary Gc**. The story of chronic myeloid leukaemia, *Br J Haematol*. 2000;110(1),2-11
- Guo F, Gong H, Zhao H, Chen J, Zhang Y, Zhang L, Shi X, Zhang HJ, Zhang J, He Y. Mutation
- Griswold IJ**, MacPartlin M, Bumm T, Goss VL, O'Hare T, Lee KA, Corbis AS, Stoffregen EP, Smith C, Moseson EM *et al*. Kinase domain mutants of Bcr-abl exhibit Alfreed transformation potency, kinase activity, and substrate utilization, irrespective of sensitivity to imatinib. *Mol Cell Biol*. 2006 Aug;26(16):6082-93
- Groffen J**, Stephenson JR, Heisterkamp N, de Klein A, Bartram CR, Grosfeld G. Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. *Cell*. 1984;36(1):93-9

Guo F, Gong H, Zhao H, Chen J, Zhang Y, Zhang L, Shi X, Zhang HJ, Zhang J, He Y. Mutation status and prognostic values of KRAS, NRAS, BRAF and PIK3CA on 353 Chinese colorectal cancer patients. *Nature*. 2018 Apr 17;8:6076

* **Hay N and Sonenberg N**. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev*. 2004 Aug 15; 18(16): 1926–1945

Hedema RH, Kops GJ, Bos JL, Burgering BM. AFX-like Forkhead transcription factors mediate cell-cycle regulation by Ras and PKB through p27kip1. *Nature*. 2000 Apr 13;404(6779):782-7

* **Geary Gc**. The story of chronic myeloid leukaemia, *Br J Haematol*. 2000;110(1),2-11

Hochhaus A, Kreil S, Corbin AS, La Rosée P, Müller MC, Lahaye T, Hanfstein B, Schoch C, Cross NC, Berger U. Molecular and chromosomal mechanisms of resistance to imatinib (STI571) therapy. *Leukemia*. 2002 Nov;16(11):2190-6

Hughes T, Saglio G, Branford S, Soverini S, Kim DW, Müller MC, Martinelli G, Cortes J, Beppu L, Gottardi E. Impact of baseline BCR-ABL mutations on response to nilotinib in patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase. *J Clin Oncol*. 2009;27:4204-10

Chen W, Xuan H, Wang Z. De Novo Acquisition of BCR-ABL Mutations for CML Acquired Resistance in Myeloid Leukemia – Basic Mechanisms of Leukemogenesis, 2011. Edited by Steffen Koschmieder and Utz Krug. Published by InTech. Janeza Trdine 9, 51000 Rijeka

Chen X, Shi X, Zhao Ch, Li X, Lan X, Liu S, Huang H, Liu N, Liao S, Zang D, *et al*. Anti-rheumatic agent auranofin induced apoptosis in chronic myeloid leukemia cells resistant to imatinib through both Bcr-Abl-dependent and independent mechanisms. *Oncotarget*. 2014 Oct;5(19)

Chengcheng F, Peishuai Ch, Wu D, and Zixing Ch. Study of Expression of Ku70 and NHEJ in CML Cells. *Blood* 2008 112(11):3223

* **Christmann M**, Tomicic MT, Roos WP, Kaina B. Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology*. 2003 Nov 15;193(1-2):3-34

Ikejiri F, Honma Y, Okada T, Urano T, Suzumiya J. Cotylenin A and tyrosine kinase inhibitors synergistically inhibit the growth of chronic myeloid leukemia cells. *Int J Oncol*. 2019 Jun;52(6):2061-2068

Ilria RL, Van Etlen RA. P210 and P190 (BCR/ABL) induce the tyrosine phosphorylation and DNA binding activity of multiple specific STAT Family members, *J Biol Chem*. 1996 Dec 6;271(49):31704-10

Issa JP, Kantarjian H, Mohan A, O'Brien S, Cortes J, Pierce S, Talpaz M. Methylation of the ABL1 promoter in chronic myelogenous leukemia: lack of prognostic significance. *Blood*. 1999 Mar 15;93(6):2075-80

Jabbour EJ, Cortes JE, Kantarjian HM. Tyrosine kinase inhibition: a therapeutic target for the management of chronic-phase chronic myeloid leukemia. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2013 Dec;13(12):1433-52

* **Jackson SP and Bartek J**. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature.* 2009 Oct 22;461(7267):1071-8

Jaruskova M, Curik N, Hercog R, Polivkova V, Motlova E, Benes V, Klamova H, Pecherkova P, Belohlavkova P, Vrbacky F, Machova Polakova K. Genotype of SLC22A4 and SLC22A5 regulatory loci are predictive of the response of chronic myeloid leukemia patients to imatinib treatment. *J Exp Clin Cancer Res.* 2017 Apr 18;36(1):55

Jette N and Lees-Miller SP. The DNA-dependent protein kinase: A multifunctional protein kinase with roles in DNA double strand break repair and mitosis. *Prog Biophys Mol Biol.* 2015 Mar;117(2-3):194-205

Jones D, Kamel-Reid S, Bahler D, Dong H, Elenitoba-Johnson K, Press R, Quigley N, Rothberg P, Sabath D, Viswanatha D, Laboratory practice guidelines for detecting and reporting BCR-ABL drug resistance mutations in chronic myelogenous leukemia and acute lymphoblastic leukemia: A report of the Association for Molecular Pathology. *J Mol Diagn.* 2009 Jan;11(1):4-11

* **Kang ZJ**, Liu YF, Yu LU, Long ZJ, Huang D, Yang Y, Liu B, Feng JX, Pan YJ, Liu Q. The Philadelphia chromosome in leukemogenesis, *Chin J Cancer.* 2016 May 27;35:48

* **Khanna KK and Jackson SP**. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet.* 2001 Mar;27(3):247-54

Khorashad JS, Wagner S, Greener L, Marin D, Reid A, Milojkovic D, Patel H, Willmott S, Reuvani K, Gerrard G, *et al.* The level of BCR-ABL1 kinase activity before treatment does not identify chronic myeloid leukemia patients who fail to achieve a complete cytogenetic response on imatinib. *Haematologica.* 2009 Jun;94(6):861-4

Keane CT. The Diagnostic Value Of Leukocyte Stains In Leukaemias, *Postgrad Med J.* 1965 Dec;41(482):753-8

Klamová H. Současný stav léčby chronické myeloidní leukemie pomocí inhibitorů tyrozinové kinázy. *Onkologie.* 2016;10(3):120-126

Kim JH, Chu SC, Gramlich JL, Pride YB, Babendreier E, Chauhan D, Salgia R, Podar K, Griffin JD, Sattler M. Activation of the p13K/mTOR pathway by BCR-ABL contributes to increased production of reactive oxygen species, *Blood.* 2005 Feb 15;105(4):1717-23

Kim JS, Krasieva TB, Kurumizaka H, Chen DJ, Taylor AM, Yokomori K. Independent and sequential recruitment of NHEJ and HR factors to DNA damage sites in mammalian cells. *J Cell Biol.* 2005 Aug 1;170(3):341-7

Kipreos ET and Wang JYJ. Cell cycle-regulated binding of c-Abl tyrosine kinase to DNA. *Science*. 1992 Apr;256:(5055)382-385.

Koptyra M, Falinski R, Nowicki MO, Stoklosa T, Majsterek I, Neiborowska-Skorska M, Blasiak J, Korski T. BCR/ABL kinase induces self-mutagenesis via reactive oxygen species to encode imatinib resistance. *Blood* 2006 Jul 1;108(1):319-27

* **Koschmann C,** Lowenstein PR, Gastro MG. ATRX mutations and glioblastoma: Impaired DNA damage repair, alternative lengthening of telomeres, and genetic instability. *Mol Cell Oncol*. 2016 May;3(3):e1167158

Kubonishi I and Miyoshi I. Establishment of a Ph1 chromosome-positive cell line from chronic myelogenous leukemia in blast crisis. *Int J Cell Cloning*. 1983 Jun1;(2):105-17

Lange T, Park B, Willis SG, Deininger MW. BCR-ABL kinase domain mutations in chronic myeloid leukemia: not quite enough to cause resistance to imatinib therapy?. *Cell Cycle*. 2005 Dec, 4;(12):1761-6

Laneuville P, Abl tyrosine protein kinase. *Semin Immunol*. 1995;7(4):255-66

Lee SM, Bae JH, Kim MJ, Lee HS, Lee MK, Chung BS, Kim DW, Kang CD, Kim SH. Bcr-Abl-independent imatinib-resistant K562 cells show aberrant protein acetylation and increased sensitivity to histone deacetylase inhibitors. *J Pharmacol Exp Ther*. 2007 Sep;322(3):1084-92

* **Li X and Heyer WD.** Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. *Cell Res*. 2008 Jan;18(1):99-113

* **Liang Y,** Lin SY, Brunicardi FC, Goss J, Li K. DNA damage response pathways in tumor suppression and cancer treatment. *World J Surg*. 2009 Apr;33(4):661-6

Lloret M, Lara PC, Mordon E, Fontes F, Rey A, Pinar B, Falcon O. Major vault protein may affect nonhomologous end-joining repair and apoptosis through Ku70/80 and bax downregulation in cervical carcinoma tumors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2009 Mar 15;73(4):976-9

Mahon FX, Belloc F, Lagarde V, Chollet C, Moreau-Gaudry F, Reiffers J, Goldman JM, Melo JV. MDR1 gene overexpression confers resistance to imatinib mesylate in leukemia cell models. *Blood*. 2003 Mar 15;101(6):2368-73

Mahon FX, Deininger MW, Schultheis B, Chabrol J, Reiffers J, Goldman JM, Melo JV. Selection and characterization of BCR-ABL positive cell lines with differential sensitivity to the tyrosine kinase inhibitor STI571: diverse mechanisms of resistance. *Blood*. 2000 Aug 1;96(3):1070-9

Mansour WY, Borgmann K, Petersen C, Dikomey E, Dahm-Daphi J. The absence of Ku but not defects in classical non-homologous end-joining is required to trigger PARP1-dependent end-joining. *DNA Repair (Amsl)*. 2013 Dec;12(12):1134-42

- Mansour WY**, Rhein T, Dahm-Daphi J. The alternative endjoining pathway for repair of DNA double-strand requires PARP1 but is not dependent upon microhomologies. *Nucleic Acid Res.* 2010 Oct;38(17):6065-77
- McWhirter JR and Wang JY.** An actin-binding function contributes to transformation by the Bcr-Abl oncoprotein of Philadelphia chromosome-positive human leukemias. *EMBO Journal.* 1993;12:1533-1546
- McWhirter JR and Wang JY.** Effect of Bcr sequences on the cellular function of the Bcr-Abl oncoprotein. *Oncogene* 1997;15:1625-1634
- * **Meek K**, Dang V, Lees-Miller SP. DNA-PK: the means to justify the ends? *Adv Immunol.* 2008;99:33-58
- Mizuchi D**, Kurosu T, Kida A, Jin ZH, Jin A, Arai A, Miura O. BCR/ABL activates Rap1 and B-Raf to stimulate the MEK/Erk signaling pathway in hematopoietic cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;326(3):645-51
- Nowicki MO**, Falinski R, Koptyra M, Slupianek A, Stoklosa T, Gloc E, Neiborowska-Skorska M, Blasiak J, Skorski T. BCR/ABL oncogenic kinase promotes unfaithful repair of the reactive oxygen species-dependent DNA double-strand breaks. *Blood.* 2004 Dec 1;104(12):3746-53
- Nowell PC and Hungerford DA.** A minute chromosome in human granulocytic leukemia. *Science.* 1960;132: 1497
- O'Brien SG**, Guilhot F, Larson RA, Gathmann I, Baccarani M, Cervantes F, Cornelissen JJ, Fischer T, Hochhaus A, Hughes T, Lechner K *et al.* Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2003 Mar 13;348(11):994-1004
- O'Brien SG**, Guilhot F, Goldman JM, Hochhaus A, Hughes TP, Radich JP, Rudoltz M, Filian J, Gathmann I, Druker BJ, Larson RA, *et al.* International Randomized Study of Interferon Versus STI751 (IRIS) 7-Year Follow-up: Sustained Survival, Low Rate of Transformation and Increased Rate of Major Molecular Response (MMR) in Patients (pts) with Newly Diagnosed Chronic Myeloid Leukemia in Chronic Phase (CMLCP) Treated with Imatinib (IM). *Blood*, 2008;112(11):186
- O'Hare T**, Eide CA, Deininger MW. Bcr-Abl kinase domain mutations, drug resistance, and the road to a cure for chronic myeloid leukemia. *Blood.* 2007 Oct 1;110(7):2242-9
- O'Hare T**, Walters DK, Stoffregen EP, Jia T, Manley PW, Mestan J, Cowan-Jacob SW, Lee FY, Heinrich MC, Deininger MW, Druker BJ *et al.* In vitro activity of Bcr-Abl inhibitors AMN107 and BMS-354825 against clinically relevant imatinib-resistant Abl kinase domain mutants. *Cancer Res.* 2005 Jun 1;65(11):4500-5

O'Hare T, Shakespeare WC, Zhu X, Eide CA, Rivera VM, Wang F, Adrian LT, Zhou T, Huang WS, Xu Q *et al.* AP24534, a pan-BCR-ABL inhibitor for chronic myeloid leukemia, potently inhibits the T315I mutant and overcomes mutatuon-based resistance. *Cancer Cell*. 2009 Nov 6;16(5):401-12

Penka M, Tesařová E *et al.* Hematologie a transfuzní lékařství I. 1 vyd. Praha: Grada Publishing a.s. 2011. 424 s. ISBN 978-80-247-7192-2

* **Petruseva IO**, Evdokimov AN, Lavrik OI. Molecular mechanism of global genome nukleotide excision repair. *Acta Naturae*. 2014 Jan;6(1):23-34

Puttini M, Coluccia AM, Boschelli F, Cleris L, Marchesi E, Donella-Deana A, Ahmed S, Redaelli S, Piazza R, Magistroni V, Andreoni F *et al.* In vitro and in vivo aktivty of SKI-606, a novel Src-Abl inhibitor, against imatinib-resistant Bcr-Abl+ neoplastic cells. *Cancer Res*. 2006 Dec 1;66(23):11314-22

* **Rassool FV**, Gaymes TJ, Omidvar N, Brady N, Beurlet S, Pla M, Reboul M, Lea N, Chomienne C, Thomas NS, Mufti GJ, Padua RA. Reactive oxygen species, DNA damage, and error-prone repair: a model for genomic instability with progression in myeloid leukemia? *Cancer Res*. 2007 Sep 15;67(18):8762-71.

Roche-Lestienne C, Lai JL, Darré S, Facon T, Preudhomme C. A mutation conferring resistance to imatinib at the time od diagnosis of chronic myelogenous leukemia. *N Engl J Med*. 2003 May 29;348(22):2265-6

Roth M, Wang Z and Chen WY. SIRT1 and LSD1 competitively regulace KU70 functions in DNA repair and station acquisition in cancer cells. *Oncotarget*. 2016 Aug 2;7(31):50195-50214

Rowley JD, A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukemia identified by quinarcine fluorescence and Giemsa staining. *Nature*. 1973;243: 290-293

Rumpold H, Wolf AM, Gruenewald K, Gastl G, Gunsilius E, Wolf D. RNAi-mediated knockdown of P-glykoprotein using a transposon-based vektor systém durably restores imatinib sensitivity in imatinib-resistant CML cell lines. *Exp Hematol*. 2005 Jul;33(7):767-75

Sallmyr A, Fan J, Datta K, Kim KT, Grosu D, Shapiro P, Small D, Rassool F, Internal tandem duplication of FLT3 (FLT3/ITD) induces increased ROS production, DNA damage and misrepair: implications for poor prognosis in AML, *Blood* 111 (2008) 3173–3182.

San José-Enériz E, Román-Gómez J, Jiménez-Velasco A, Garate L, Martin V, Cordeu L, Vilas-Zornoza A, Rodríguez-Otero P, Calasanz MJ, Prósper F, Agirre X. MicroRNA expression profilig in Imatinib-resistant Chronic Myeloid Leukemia patients without clinically significant ABL-mutations. *Mol Cancer*. 2009 Sep 1;8:69

Shah NP, Nicoll JM, Nagar B, Gorre ME, Paquette RL, Kuriyan J, Sawyers CL. Multiple BCR-ABL kinase domain mutations confer polyclonal resistance to the tyrosine kinase inhibitor imatinib (STI571) in chronic phase and blast crisis chronic myeloid leukemia. *Cancer Cell*. 2002 Aug;2(2):117-25.

Sharma N, Magistrini V, Piazza R, Citterio S, Mezzatesta C, Khandelwal P, Pirola A, Gambacorti-Passerini C. BCR/ABL1 and BCR are under the transcriptional control of the MYC oncogene. *Mol Cancer*. 2015 Jul 16;14:132

Shitivelman E, Lifshitz B, Gale RP, Canaani E. Fused transcript of abl and bcr genes in chronic myelogenous leukaemia. *Nature* 1985;315(6020):550-4

Soverini S, Hochhaus A, Nicolini FE, Gruber F, Lange T, Saglio G, Pane F, Müller MC, Ernst T, Rosti G *et al*. BCR-ABL kinase domain mutation analysis in chronic myeloid leukemia patients treated with tyrosine kinase inhibitors: recommendations from an expert panel on behalf of European LeukemiaNet. *Blood* 2011;118(5):1208-15

Soverini S, Gnani A, Colarossi S, Castagnetti F, Abruzzese E, Paolini S, Merante S, Orlandi E, de Matteis S, Gozzini A *et al*. Philadelphia-positive patients who already harbor imatinib-resistant Bcr-Abl kinase domain mutations have a higher likelihood of developing additional mutations associated with resistance to second- or third-line tyrosine kinase inhibitors. *Blood*. 2009;114(10):2168-71

Soverini S, Colarossi S, Gnani A, Castagnetti F, Rosti G, Bosi C, Paolini S, Rondoni M, Piccaluga PP, Palandri F, Giannoulis P *et al*. Resistance to dasatinib in Philadelphia-positive leukemia patients and the presence of the selection of mutations at residues 315 and 317 in the BCR-ABL kinase domain. *Haematologica* 2007;92(3):401-4

* **Sung SJ and Dimple B**. Role of base excision repair subpathways in correcting oxidized abasic sites in DNA. *FEBS J*. 2006 Apr;273(8):1620-9

Stoklosa T, Poplawski T, Koptyra M, Neiborowska-Skorska M, Masak G, Slupianek A, Rayevskaya M, Sefernynska I, Herrera L *et al*. BCR/ABL inhibits mismatch repair to protect from apoptosis and induce point mutations. *Cancer Res*. 2008 Apr 15;68(8):2576-80

Tang C, Schafranek L, Watkins DB, Parker WT, Moore S, Prime JA, White DL, Hughes TP. Tyrosine kinase inhibitor resistance in chronic myeloid leukemia cell lines: investigating resistance pathways. *Leuk Lymphoma*. 2011 Nov;52(11):2139-47

Tobin LA, Robert C, Rapoport AP, Gojo I, Baer MR, Tomkinson AE, Rassool FV. Targeting abnormal DNA double-strand break repair in tyrosine kinase inhibitor-resistant chronic myeloid leukemias. *Oncogene*. 2013 Apr 4;32(14):1784-93

Thomas J, Wang L, Clark RE, Pirmohamed M. Active transport of imatinib into and out of cell: implications for drug resistance. *Blood*. 2004 Dec 1;104(12):3739-45

Tokarski JS, Newitt JA, Chang CY, Cheng JD, Wittekind M, Kiefer SE, Kish K, Lee FY, Borzilleri R, Lombardo LJ, Xie D *et al.* The structure of Dasatinib (BMS-354825) Bound to activated ABL Kinase Domain Elucidates Its Inhibitory Activity against Imatinib-Resistant ABL Mutants. *Cancer Res.* 2006 Jun 1;66(11):5790-7

Van Etten RA, Jackson P, Baltimore D. The mouse type IV c-abl gene product is a nuclear protein, and activation of transforming ability is associated with cytoplasmic localization. *Cell.* 1989;58:669-678.

Virdee K, Parone PA, Tolkovsky AM Phosphorylation of the pro-apoptotic protein BAD on serine 155 a novel site, contributes to cell survival. *Curr Biol.* 2000 Sep 21;10(18):1151-4

Wang L, Giannoudis A, Lane S, Williamson P, Pirmohamed M, Clark RE. Expression of the uptake drug transporter hOCT1 is an important clinical determinant of the response to imatinib in chronic myeloid leukemia. *Clin Pharmacol Ther.* 2008 Feb;83(2):258-64

Wang Z, Liu Z, Wu X, Chu S, Wang J, Yuan H, Roth M, Yuan YC, Bhatia R, Chen W. ATRA-induced cellular differentiation and CD38 expression inhibits acquisition of BCR-ABL mutations for CML acquired resistance. *PLoS Genet.* 2014 Jun 26;10(6)

Wang Z, Yuan H, Roth M, Stark JM, Bhatia R, Chen WY. SIRT1 deacetylase promotes acquisition of genetic mutations for drug resistance in CML cells. *Oncogene.* 2013 Jan 31;32(5):589-98

Yuan H, Wang Z, Gao C, Chen W, Huang Q, Yee JK, Bhatia R, Chen W. BCR-ABL gene expression is required for its mutations in a novel KCL-22 cell culture model for acquired resistance of chronic myelogenous leukemia. *J Biol Chem.* 2010 Feb;285: 5085– 5096

Xie S, Lin H, Sun T, Arlinghaus RB. Jak2 is involved in c-Myc induction by Bcr-Abl. *Oncogene.* 2002 Oct 17;21(47):7137-46

* **Weisberg E**, Manley P, Mestan J, Cowan-Jacob S, Ray A, Griffin JD. AMN107 (nilotinib): a novel and selective inhibitor of BCR-ABL. *Br J Cancer.* 2006 Jun 19;94(12):1765-9

Willis SG, Lange T, Demehri S, Otto S, Crossman L, Niederwieser D, Stoffregen EP, McWeeney S, Kovacs I, Park B, Druker BJ, Deininger MW. High-sensitivity detection of BCR-ABL kinase domain mutations in imatinib-treated patients: correlation with clonal cytogenetic evolution but not response to therapy. *Blood.* 2005 Sep 15;106(6):2128-37

* **Zhou BB and Bartek J.** Targeting the checkpoint kinases: chemosensitization versus chemoprotection. *Nat Rev Cancer.* 2004 Mar;4(3):2016-25

Zhao LJ, Wang YY, Guo L, Ma LY, Xiong SM, Weng XQ, Zhang WN, Wu B, Chen B, Chen SJ. Functional features of RUNX1 mutants in acute transformation of chronic myeloid leukemia and their contribution to inducing murine full-blown leukemia. *Blood.* 2012;119(12):2873-2882

Žáčková D., *Chronická myeloidní leukemie : informace pro pacienty a jejich blízké.* 1.vyd.
Brno: Česká leukemická skupina – pro život (CELL), 2012. 84 s. ISBN 978-80-260-1828-5.

* review

Internetové stránky:

Epidemiologie

[www.svod.cz,http://www.svod.cz/report.php?diag=C92.1&type=pdf](http://www.svod.cz/report.php?diag=C92.1&type=pdf)

obr. Ph chromozomu

<https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms?cdrid=44179>